

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA



TESIS DOCTORAL

**Valor pronóstico de la sobre-expresión de receptor del factor
de crecimiento epidérmico (EGFR) y ciclo-oxigenasa-2
(COX-2) en el carcinoma epidermoide localmente avanzado
de cérvix**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Mary Katharine Aylas Guzmán

DIRECTOR

José Pérez-Regadera Gómez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA



TESIS DOCTORAL

**VALOR PRONÓSTICO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN
DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO (EGFR) Y CICLO-OXIGENASA- 2
(COX-2) EN EL CARCINOMA EPIDERMOIDE
LOCALMENTE AVANZADO DE CÉRVIX**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

MARY KATHARINE AYLAS GUZMÁN

Director:
José Pérez-Regadera Gómez
Madrid, 2015

**VALOR PRONÓSTICO DE LA SOBRE-EXPRESIÓN
DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO (EGFR) Y CICLOOXIGENASA- 2
(COX-2) EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE
LOCALMENTE AVANZADO DE CÉRVIX**

Doctorando:
Mary Aylas Guzmán

Director:
José Pérez-Regadera Gómez.

**Servicio de Oncología Radioterápica
Hospital Universitario 12 de Octubre
Facultad de Medicina U.C.M.
Octubre 2015**

A la memoria de dos fuerzas entrañables que fueron ejemplo de vida y virtud, mujeres valientes y tenaces, las cuales me enseñaron a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Mis abuelas: Dominga y María Luz.

AGRADECIMIENTOS:

Deseo agradecer al Dr. José Pérez-Regadera Gómez no sólo por su tiempo y dedicación en la dirección del presente trabajo sino también por su amistad y apoyo moral durante el proceso.

A mis padres Elsa y Antenor por todos los esfuerzos y sacrificios realizados para darme una de las más nobles profesiones, y a mi hermana Karla por su cariño y aliento aun en la distancia.

A mis maestros: Dra. Coaila y Dr. Ruiz por las enseñanzas impartidas en los primeros años de mi profesión.

A todas las personas que componen el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario 12 Octubre de Madrid, en especial a médicos adjuntos y compañeros residentes; lugar que siempre recordaré con especial cariño, pues fue donde me dieron las bases en mi formación como especialista.

Al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 Octubre de Madrid, en especial agradecer al Dr. Claudio Ballestín por su tiempo e incondicional apoyo.

A la Unidad de Epidemiología - Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, y en especial a David Lora y Javier de la Cruz por la colaboración otorgada en el análisis estadístico de los resultados.

ÍNDICE:

I. JUSTIFICACIÓN	9
II. INTRODUCCIÓN AL TEMA:	
2. CARCINOMA DE CUELLO UTERINO:	
2.1 Epidemiología	12
2.2 Etiología	13
2.3 Historia natural	15
2.4 Cuadro clínico y diagnóstico	22
2.5 Estudios de extensión y estadiaje	24
2.6 Tratamiento del cáncer de cérvix localmente avanzado	30
2.7 Prevención – vacunación	42
2.8 Factores pronósticos	43
3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EN TUMORES SÓLIDOS	46
4. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EN EL CARCINOMA DE CUELLO UTERINO	51
5. USO DE INHIBIDORES DEL EGFR EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CÉRVIX	63
6. EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) EN TUMORES SÓLIDOS	65
7. EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) EN EL CARCINOMA DE CUELLO UTERINO	70
8. USO DE INHIBIDORES DE COX-2 EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CÉRVIX	80
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	82
IV. MATERIALES Y MÉTODOS:	83
- Población estudiada	83
- Tratamiento radioterápico	85
- Tratamiento quimioterápico	86
- Seguimiento de las pacientes	86
- Análisis molecular-inmunohistoquímica	87
- Análisis estadístico	89
V. RESULTADOS:	91
- Análisis de las pacientes	91
- Respuesta a la radio-quimioterapia concurrente	94
- Resultados del seguimiento de las pacientes	95
- Resultados de toxicidad	98

- Patrón de recaída en función a la sobreexpresión aislada y conjunta de EGFR y COX-2	99
- Relación entre sobre-expresión de EGFR y/o COX-2 y las clásicas variables pronósticas.....	102
- Análisis univariante para la supervivencia libre de enfermedad de los factores pronósticos estudiados.....	104
- Análisis multivariante para la supervivencia libre de enfermedad de los factores pronósticos estudiados.....	114
- Análisis univariante para la supervivencia libre de fracaso pélvico de los factores pronósticos estudiados.....	115
- Análisis multivariante para la supervivencia libre de fracaso pélvico de los factores pronósticos estudiados.....	125
VI. DISCUSION	127
VII. CONCLUSIONES	131
VIII. BIBLIOGRAFIA	132
ANEXO I. RESUMEN DE LA TESIS EN INGLES – ARTICULO EN PROCESO DE PUBLICACION	166

I. JUSTIFICACIÓN:

El cáncer de cérvix es un tumor maligno muy frecuente entre las mujeres del mundo entero, sobre todo en los países menos desarrollados, ocupando el cuarto lugar como causa de muerte por cáncer a nivel mundial.

En los últimos años debido a la implantación masiva de los métodos de screening, avances en el diagnóstico precoz (citología cervico-vaginal, detección del DNA del Virus Papiloma Humano - HPV mediante PCR), así como las mejoras en el tratamiento, se ha logrado disminuir las tasas de incidencia y mortalidad en los países más desarrollados.

Empero en los países con menor desarrollo socio-económico, el screening del cáncer de cuello uterino (Papanicolaou) implica una prueba de difícil implementación, debido a requisitos tales como: repetición periódica de la prueba, experiencia en la preparación de las muestras y en la interpretación del diagnóstico, además de la escasa educación sanitaria que la población posee.

En lo que respecta al tratamiento de las pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado, el uso de la radio-quimioterapia concurrente (basada en cisplatino) ha logrado mejorar las tasas de supervivencia y en la actualidad continua siendo considerada como el tratamiento estándar.

Sin embargo, a pesar de haberse demostrado mejorías en las tasas de supervivencia por la administración de la radio-quimioterapia concurrente, cerca de un tercio de las pacientes con carcinoma de cérvix localmente avanzado presentarán recurrencia de la enfermedad entre los 2 a 3 primeros años tras finalizar el tratamiento inicial, es así que un significativo número de pacientes no alcanzarán el control pélvico y eventualmente fallecerán por la enfermedad.

Es así que se ha postulado que algunos tumores serían biológicamente más agresivos o más refractarios al tratamiento que otros y por ello algunas pacientes con semejante estadio y características clínicas responderían de forma diferente al tratamiento estándar.

En algunos casos se ha observado que esta agresividad no está enteramente relacionada con los bien conocidos factores clínico-patológicos involucrados en la evolución de la enfermedad (estadio clínico FIGO, tamaño tumoral, afectación de ganglios pélvicos y/o para-aórticos, invasión en profundidad del estroma, invasión linfo-vascular, tipo histológico, grado de diferenciación histológica) y por tanto la utilidad de éstos en el pronóstico a veces resulta insuficiente.

Debido a que los mecanismos moleculares de agresividad tumoral son usualmente dependientes del estímulo proliferativo inducido por varios promotores tumorales, numerosos proto-oncogenes y oncogenes (reguladores del crecimiento, diferenciación y motilidad de las células tumorales), éstos han sido investigados con el fin de

identificar moléculas blanco que podrían ser usadas como potenciales predictores de la supervivencia y/o respuesta al tratamiento del cáncer. Es así que una variedad de biomarcadores tales como: Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Ciclooxygenasa-2 (COX-2), coexpresión EGFR/c-erbB-2, Hypoxia inducible Factor-1 α (HIF-1 α), han sido estudiados en el carcinoma de cérvix.

De un gran número de marcadores biológicos, el EGFR ha recibido mucha atención durante las últimas décadas, ésta es una glicoproteína transductora de membrana que posee una actividad tirosin-kinasa. La dimerización inducida por el ligando y la autofosforilación del EGFR activa una vía de señal de transducción; por estimulación de la actividad intrínseca de la tirosin-kinasa y la fosforilación de diferentes proteínas blanco, lo cual conduce a un incremento de la replicación del DNA, la estimulación y proliferación celular.

La expresión incrementada del EGFR ha sido observada en diferentes líneas celulares experimentales y en tumores humanos sólidos. En el caso del cáncer de cérvix, la incidencia de la sobre-expresión del EGFR ha sido reportada de forma variable de acuerdo a las técnicas de detección y métodos usados.

La mayoría de los estudios que incluyen a pacientes con cáncer de cérvix han mostrado que niveles elevados de EGFR se relacionan con un comportamiento biológico más agresivo y son clínicamente relevantes para un mal pronóstico, aunque también existen otros estudios que no objetivan dichos hallazgos.

De otro lado, la Ciclo-oxigenasa (COX-2) es la enzima clave en la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas y otros eicosanoides. La COX-2 es una citoquina-enzima inducible que altera las diferentes respuestas celulares involucradas en la regulación del ciclo celular, está asociada a la inhibición de la apoptosis, al estímulo de la angiogénesis patológica, y a procesos que afectan la adhesión celular y la vigilancia inmune.

De ahí que la sobreexpresión de la COX-2 ha sido también considerada como un indicador de agresividad e invasividad tumoral, así como un predictor potencial metastásico en varios tipos de cánceres incluyendo el cáncer de cérvix. Estudios preclínicos en vivo y en vitro han demostrado que la amplificación del gen y/o expresión de la proteína COX-2 es rápidamente inducida en respuesta a varios promotores tumorales, factores de crecimiento, oncogenes y carcinógenos.

Respecto a la relación entre EGFR y COX-2, diversos estudios han reportado que la activación de la vía de señal de la EGFR aumenta la transcripción del gen COX-2 en diferentes tipos celulares.

Entonces en la literatura se describe que EGFR y COX-2 juegan un rol importante en la transformación oncogénica, carcinogénesis e invasividad tumoral; pero poca

información se encuentra disponible respecto a la relación entre EGFR y COX-2 y el carcinoma de cérvix.

Nuestro interés reside en encontrar la relación existente entre la célula tumoral con fenotipo agresivo y los llamados marcadores biológicos EGFR y COX-2, mediante la evaluación de los patrones de fracaso al tratamiento y las tasas de supervivencia.

Debido a que el éxito de cualquier tratamiento, depende también de una predicción válida del pronóstico, dianas moleculares adicionales serían necesarias para evaluar más adecuadamente el comportamiento tumoral en cada paciente de forma individual y así adaptar nuevas estrategias de tratamiento en aquellas pacientes con factores moleculares de riesgo.

II. INTRODUCCIÓN AL TEMA:

2. CARCINOMA DE CUELLO UTERINO

2.1 EPIDEMIOLOGIA:

En los últimos 30 años, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha publicado estimaciones periódicas de la incidencia y la mortalidad por cáncer en el mundo, a través de su serie GLOBOCAN. Es así que a nivel mundial en el año 2012, se estimaron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer y 8.2 millones de muertes por cáncer; más de la mitad de los casos de cáncer (56.8%) y las muertes por cáncer (64.9%) se produjeron en las regiones menos desarrolladas del mundo (1)

El carcinoma de cérvix es el cuarto tipo más común de cáncer en las mujeres a nivel mundial (después del cáncer de mama, colo-rectal y pulmón), con un estimado de 528.000 nuevos casos al año; y también es la cuarta causa más común de muerte por cáncer (266.000 muertes en el año 2012). Las tasas estandarizadas de la incidencia por edad varían mucho entre los diferentes países, desde <1 a >50 por 100.000 (2); aunque más del 70% de la carga mundial se produce en los países menos desarrollados.

Más aún en muchos países con menor desarrollo socio-económico, el cáncer de cérvix es la primera causa de mortalidad por cáncer en las mujeres, por delante incluso del cáncer de mama, es así que en África subsahariana, 34,8 nuevos casos de cáncer de cérvix son diagnosticados por cada 100 000 mujeres al año y 22,5 por 100 000 mujeres mueren por esta enfermedad; cifras muy alejadas del 6.6 y 2.5 por 100 000 mujeres, respectivamente en América del Norte, estas drásticas diferencias pueden explicarse por la falta de acceso a servicios que faciliten la detección precoz y el tratamiento.

En España, la incidencia se puede considerar baja (7.8 de nuevos casos/100.00 mujeres al año), con un descenso muy importante desde los años 60 y actualmente está estabilizada; posiblemente una causa de este stop en el descenso, sea el aumento de la migración de mujeres provenientes de países con mayor incidencia (África Oriental, Occidental y del Sur, Asia del Sur Central, América del Sur y Central y el Caribe); en el año 2012, aproximadamente 2511 mujeres fueron diagnosticadas de cáncer de cérvix y 848 murieron por la enfermedad (1).

La mortalidad por cáncer de cérvix en España está disminuyendo debido a la masiva implantación de los métodos de screening en la detección precoz; sin embargo la diferente velocidad de descenso en las comunidades autónomas podría estar relacionada con la frecuencia de exposición al Virus del Papiloma Humano (HPV), diferencias en la implementación de los programas de cribado y por factores socioeconómicos (3).

El cáncer de cérvix es un tumor propio de las edades medias de la vida. Las tasas de incidencia específica por edad revelan un único patrón: en los países más desarrollados las tasas son altas en las mujeres más jóvenes pero luego se produce una meseta a partir de los 40 años, en cambio en los países con menor desarrollo las tasas son más bajas en las mujeres más jóvenes pero posteriormente aumentan después de los 40 años y se

vuelven muy superiores respecto a los países con mayor desarrollo, el patrón en los países más desarrollados puede atribuirse en parte a las prácticas de cribado (4).

Un grupo especial lo conforman las mujeres posmenopáusicas, en muchas poblaciones se ha demostrado un segundo pico de prevalencia de los HPV de alto riesgo; los datos sugieren que entre las mujeres que no erradican su infección por HPV de alto riesgo, en la menopausia se produce una transición de infecciones múltiples a un solo tipo de infección, seleccionándose un clon viral integrado, dando lugar a un proceso de enfermedad agresiva y progresiva (5).

2.2 ETIOLOGIA:

El carcinoma de cérvix es considerada una enfermedad de transmisión sexual, cuyo agente necesario pero insuficiente es el HPV (6,7). La asociación observada entre el HPV y el cáncer de cérvix es la más sólida de las halladas en el estudio del cáncer humano, debido a la presencia de HPV en la práctica totalidad de los cánceres cervicales.

La extrema rareza de cánceres de cérvix HPV negativos, refuerza la necesidad de la realización de test diagnósticos para HPV en todos los screening rutinarios en adición a la citología cervical (6).

Sin embargo no todas las infecciones por HPV progresan y desarrollan patología neoplásica, se requieren diversos factores asociados para desarrollar la enfermedad. Se reconoce que según el tipo de virus, su persistencia en el tiempo en exámenes de cribado repetidos o la carga viral, desempeñarían un efecto importante en la aparición de la patología.

Aproximadamente 40 tipos de HPV son reconocidos como agentes infectantes en el tracto urogenital, de los cuales 14 son oncogénicos o de alto riesgo, cuya incidencia varía según la región geográfica (8). La mayoría de los tipos de alto riesgo están relacionados al HPV16 -31, 33, 35,52 y 58 o al HPV18 -39, 45,59 y 68 (9).

El HPV consiste en partículas de ADN de 8000 pares de bases de doble cadena circular, recubiertos por una cascara compuesta por dos moléculas -L1 y L2-. El genoma codifica dichas moléculas y al menos otras seis proteínas E1, E2, E4-7, las cuales son necesarias para la replicación viral, el HPV se adapta perfectamente a su hospedero (tejido de diferenciación epitelial de piel o mucosa) y explota la maquinaria celular a sus propios propósitos (10).

Las proteínas E6 y E7 inducen la proliferación y eventual inmortalización de las células epiteliales. La interacción mejor estudiada es con las proteínas pRB y p53, que modifican el proceso normal de apoptosis. La sorprendente capacidad del HPV para producir malignidad se puede explicar por este proceso: la constante actividad de las proteínas E6 y E7 conllevan a una inestabilidad genómica, acumulación de oncogenes, descontrol en el crecimiento celular y finalmente cáncer (11).

Entre los co-factores desencadenantes de la enfermedad encontramos:

- a. Edad: Es característico de la edad fértil, con un pico de máxima incidencia entre los 45 y 60 años (12). Es muy raro por debajo de los 20 años. En mayores de 65, se asocia a distintos tipos de HPV, siendo menos frecuente la mutación de p53 (13).
- b. Paridad: Se ha demostrado que el número de partos influye en una mayor incidencia del carcinoma de cérvix (14). Se cree que se debe a las reacciones inmunológicas, acción hormonal y a los déficits nutricionales asociados al embarazo.
- c. Conducta sexual: El factor de riesgo más estudiado, reconocido desde el siglo XIX (15). La edad del primer contacto sexual y el contacto con múltiples compañeros sexuales elevan la incidencia del carcinoma de cuello uterino, llegando a obtenerse un riesgo relativo (RR) de 10,2 en las mujeres con múltiples parejas sexuales (14,15). También se ha estudiado la promiscuidad de los varones, obteniéndose en los estudios un RR entre 7 y 15 para los maridos de mujeres con displasia cervical (16,17).
- d. Factores socio-económicos: Tras corregir estos factores de confusión se obtienen RR de 2.2 en poblaciones con bajo status social, directamente relacionado con el factor nutricional (18).
- e. Factores Genéticos: El desarrollo de la patología tumoral se asocia a ciertos subtipos de antígenos leucocitarios (antígeno leucocitario 61*03) o en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) presentan una expresión de HLA-DQB (19, 20).
- f. Inmunosupresión: Tanto de nacimiento como adquirida (VIH, inmunosupresión en trasplantados), se asocia al desarrollo de la progresión tumoral (21, 22).
- g. Tabaco: Las mujeres fumadoras muestran un mayor riesgo de padecer carcinoma cervical con un RR de 3.0. Se ha encontrado una concentración de nicotina y cotinina muy superior a la observada en el plasma. Se cree que el tabaco actúa en estadios precoces de la carcinogénesis (23,24).
- h. Anticonceptivos: Los anticonceptivos de barrera se han mostrado eficaces para disminuir el riesgo de carcinoma cuello uterino. Los espermicidas también, al poseer un poder erradicador local sobre el HPV (25). Sin embargo los anticonceptivos hormonales se han asociado a un incremento de la incidencia de displasias cervicales, con un RR que varía según la serie y la población: habrían grandes diferencias según el tiempo de uso, edad y otros factores asociados (26,27).
- j. Coinfecciones: Otras enfermedades de transmisión sexual han sido identificadas como factores coadyuvantes al HPV para la generación del carcinoma de cuello uterino. La Chlamydia trachomatis parece actuar por inducir inflamación crónica y metabolitos mutagénicos (28,29). El Herpes simple tipo 2 también parece actuar como cofactor, con una evidencia dudosa (30).

2.3 HISTORIA NATURAL:

ANATOMIA NORMAL:

El cuello uterino es la porción inferior del útero, delimitado por arriba por el istmo y protruye en la vagina. Mide entre 2,5 y 3 cm de longitud en la nulípara y se ubica hacia atrás en forma oblicua. Se divide en la porción vaginal o exocérvis y el canal o endocérvis. El exocérvis presenta dos labios –el anterior y el posterior– delimitados por el orificio cervical externo. La irrigación sanguínea está dada por ramas de las arterias uterinas que ingresan lateralmente a través de los ligamentos de Mackenrodt que junto a los ligamentos uterosacros sirven para fijar y suspender el órgano. La irrigación venosa es paralela a la arterial. La red linfática nace cerca de la mucosa y en la profundidad del estroma para dar origen a cuatro diferentes canales eferentes que drenan hacia los ganglios iliacos externos, obturadores, hipogástricos e iliacos.

HISTOLOGIA NORMAL:

Histológicamente, el cuello uterino tiene dos porciones bien delimitadas: la que protruye dentro de la vagina: “el exocérvis”, y el canal endocervical.

El exocérvis está tapizado por un epitelio escamoso no queratinizado similar al epitelio vaginal, que se divide en 3 estratos: estrato basal/parabasal, constituido por células encargadas del crecimiento y la regeneración epitelial; estrato medio o estrato espinoso, formado por células que están madurando; y el estrato superficial que es el compartimento más diferenciado del epitelio, cuya función es de protección y evitar de infecciones.

El endocérvis está formado por una hilera de células cilíndricas mucíparas que revisten la superficie y las estructuras glandulares. Estas estructuras glandulares son invaginaciones tortuosas del epitelio superficial, no son glándulas verdaderas. La ramificación y los cortes determinan que estas ramificaciones presenten un aspecto nodular llamado Tunnel clusters (31).

La zona de transformación: La unión escamo-columnar es el punto en el cual el epitelio escamoso del exocérvis se une al epitelio cilíndrico mucíparo del endocérvis. En el momento del nacimiento, éste punto de unión se encuentra en el orificio cervical externo y se denomina unión escamo-columnar original.

Durante la infancia y la pubertad se produce su alargamiento con la consiguiente salida del epitelio mucíparo que forma un ectropión fisiológico; éste presenta su máximo desarrollo durante la menarquia y los primeros años de la vida reproductiva; posteriormente este epitelio mucíparo es reemplazado por un epitelio escamoso de tipo metaplásico.

La unión entre este nuevo epitelio escamoso y el epitelio cilíndrico vuelve a encontrarse en el orificio cervical externo y se llama ahora unión escamo-columnar fisiológica o funcional. La zona comprendida entre la unión escamo-columnar original y la funcional se denomina zona de transformación, está revestida por epitelio escamoso de tipo metaplásico y es el lugar de asiento de todas las lesiones precursoras del cáncer de cuello uterino.

Llamamos metaplasia escamosa al reemplazo del epitelio cilíndrico mucíparo por epitelio escamoso, esto ocurre por dos mecanismos: por epitelización o crecimiento del epitelio escamoso en la zona de la unión y por proliferación de células de reserva que se diferencian hacia el epitelio escamoso. Cuando la metaplasia escamosa comienza a producirse, las células de reserva son muy inmaduras y en general se debe establecer el diagnóstico diferencial con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (31,32).

DESARROLLO PATOLOGICO:

La historia natural de esta enfermedad implica la progresión gradual por etapas intraepiteliales pre invasoras. Esta progresión gradual ha sido ampliamente estudiada y objeto de gran debate para lograr una correcta clasificación: Desde 1989 se utiliza la clasificación desarrollada en Bethesda por el National Cancer Institute, corregida en 1991 y 2001 (Tabla nº1); en ella se creó una terminología uniforme de los resultados de las citologías y biopsias de cérvix que evitase definiciones ambiguas y de significado clínico incierto.

Existen dos tipos de lesiones: las lesiones de bajo grado (*low grade*), incluyen las alteraciones celulares por infección de HPV y las displasias leves (CIN-1); las lesiones de alto grado (*high grade*) incluyen las displasias moderadas y graves (CIN-2, CIN-3), y el carcinoma *in situ*. Dentro de la clasificación se añadió las lesiones de significado indeterminado con atipia de células escamosas (atypical squamous cells of undetermined significance, ASCUS) (33, 34).

Las lesiones de bajo grado (low-grade squamous intraepithelial lesion, LSIL) en su mayor parte desaparecerán de manera espontánea, incluso sin tratamiento, si bien también es posible su transformación en lesiones de mayor grado (33). La predicción de la evolución hacia una lesión de alto grado o carcinoma in situ es muy difícil, se utiliza el marcador p16^{INK4a} como predictor de la evolución de los CIN-1 (35).

Las lesiones de alto grado (high-grade squamous intraepithelial lesion, HSIL) se consideran de mayor potencial para la transformación maligna, y está justificado su tratamiento a partir de las guías terapéuticas. (34).

Tabla n°1. INFORME CITOLÓGICO Sistema Bethesda modificado, 2001

VALORACIÓN DE LA MUESTRA

Satisfactoria	No datos clínicos
Insatisfactoria	Error en identificación
Muestra rechazada / no procesada	Artefacto
Muestra procesada y examinada	Hipocelularidad
	Citolisis
	Inflamación
	Fondo hemático
	Ausencia células endocervicales

INTERPRETACIÓN/ RESULTADO

Valoración funcional

Compatible con edad e historia. No compatible con edad e historia. No valorable.

Negativo para lesión intraepitelial o malignidad

Infección:

Trichomonas vaginalis

Hongos (consistentes con *Candida sp*)

Cambios en flora sugestivos de vaginosis bacteriana

Bacterias consistentes con *Actinomyces sp*

Cambios celulares sugestivos de virus del Herpes simple

Otros

Cambios celulares reactivos asociados con:

Inflamación (incluye reparación típica)

Atrofia (“vaginitis atrófica”)

Radioterapia

DIU

Células glandulares (posthisterectomía)

Otros

Anomalías de la célula epitelial

Células escamosas:

Células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS): no se pueden excluir lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado.

Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado abarcando (LSIL): infección por HPV, displasia leve (CIN-1)

Lesión escamosa intraepitelial de alto grado abarcando (HSIL): displasia moderada y severa (CIN-2, CIN-3), y carcinoma *in situ*.

Sugestivo de carcinoma de células escamosas

Células glandulares:

Células glandulares atípicas (endocervicales, endometriales, sin especificar,

Células endometriales en mujeres >40años)

Sugestivo de Adenocarcinoma

CARCINOMA *IN SITU*:

El carcinoma *in situ* es un precursor del carcinoma infiltrante; existen focos de carcinoma *in situ* y de carcinoma infiltrante coexistentes de forma frecuente en las enfermas con tumores de cérvix; la mayoría de los carcinomas infiltrantes de cérvix se originan a partir de focos de displasia o carcinoma *in situ*.

Hasta un 70% de las mujeres no tratadas y seguidas durante un mínimo de 12 años tras el diagnóstico de un carcinoma *in situ*, desarrollarán un carcinoma infiltrante; sin embargo la velocidad de progresión no es en absoluto uniforme y no es posible predecir la evolución individual (36).

Las alteraciones arquitecturales en el epitelio son muy evidentes, hay pérdida de la relación citoplasma-núcleo, predominando el segundo; la totalidad del epitelio está formado por células que han perdido la polaridad, están orientadas en distintos sentidos, están dispuestas en varias filas siendo imposible diferenciar cada uno de los estratos de un epitelio normal.

En cuanto al tipo histológico de carcinoma epidermoide *in situ* hay muchas controversias, se diferencian hasta 3 tipos: a) el carcinoma *in situ* de células escamosas, de células grandes o queratinizante, habitualmente situados en el ectocervix. b) de células pequeñas, precursores del carcinoma invasor de células pequeñas, se suelen encontrar generalmente en el interior del canal endocervical; c) de células grandes no queratinizante, situados generalmente en la zona de transformación, son los tipos de carcinoma *in situ* más frecuentes (37).

El Adenocarcinoma *in situ* (ADCis) se caracteriza por atipias en el epitelio columnar de las glándulas cervicales en superficie y en profundidad con espesor de invasión máxima de 4mm (con 2,6mm de promedio) y una extensión en superficie máxima de 30x25mm; la atipia se caracteriza por la pseudoestratificación celular en las glándulas (38).

El carcinoma *in situ* adenoescamoso procede vía directa de una metaplasia escamosa donde se ha producido transformación glandular.

CARCINOMA INVASOR O INFILTRANTE:

La progresión hacia la invasión es más común cuanto mayor es el área ocupada por la lesión precancerosa.

El concepto de carcinoma microinvasor de cérvix se refiere a cánceres con invasión limitada, cuyo epitelio neoplásico invade el estroma en profundidad en menos de 3 mm, sin estar demostrada la afectación linfovascular; tienen buen pronóstico y no necesitan de tratamientos quirúrgicos tan radicales como aquellos de extensión local cervical más avanzada.

El cáncer invasor propiamente dicho se va diferenciando según el tamaño de la afectación, cuando está limitado a un máximo de 5mm de espesor y no más de 7 mm en superficie es un estadio IA; este estadio suele ser diagnosticado sólo microscópicamente.

Los cánceres de cérvix inician su crecimiento invasor a expensas del estroma fibromuscular, lo infiltran o lo comprimen destruyéndolo. Pueden ser endofíticos, exofíticos o una combinación de ambos. El carcinoma endocervical puro es una entidad a parte y su crecimiento es siempre endofítico.

La dirección de crecimiento en el cérvix varía, el tumor crece eventualmente en todas las direcciones, predominantemente en uno de los labios cervicales o afectando más a uno que a otro. El crecimiento del cáncer es generalmente lateral, dirigiéndose hacia los tejidos parametriales. Sólo los tumores voluminosos (“bulky”) sobrepasan los límites anterior o posterior del cérvix. El grado de invasión del estroma cervical es un factor pronóstico *per se*, independiente de si existe o no afectación del espacio linfovascular (39).

Cuando el cáncer cervical continúa su extensión hacia la zona lateral de los parametrios (anterior, laterales y posterior) llega al límite más externo que es la pared pélvica; el grado de afectación de éstos condiciona la estadificación según describe el sistema FIGO. Lo más habitual es que el parametrio esté afecto en toda su continuidad a través del ligamento cardinal. El porcentaje de afectación parametrial varía según los estadios, y se relaciona de forma directa con el tamaño tumoral (40).

Extensión hacia vagina: la afectación continúa a través del tejido conectivo subepitelial de la vagina, hace a ésta rígida, empastada y no flexible al tacto. El epitelio vaginal raras veces está afecto, más aún cuando el cáncer no está en un estadio avanzado. Si la invasión vaginal por el tumor es de forma discontinua, la vía de diseminación va a ser los vasos linfáticos, en estos casos los focos de células tumorales pueden estar aislados bajo el epitelio sano, estando a veces éste ulcerado; por dicho motivo, el límite macroscópico entre el tumor y el epitelio escamoso vaginal sano no siempre es el mismo que el límite microscópico (41).

Extensión Uterina: como en la extensión hacia vagina, la extensión del tumor hacia el cuerpo uterino no se realiza primariamente y sólo es realmente importante en estadios avanzados de la enfermedad; generalmente hay una invasión del estroma subepitelial a través de las canalizaciones linfovascuales subendometriales. El límite entre la mucosa cervical y la endometrial suele estar primitivamente intacto. Todos los cánceres cervicales escamosos inician su extensión hacia útero afectando primero al tejido músculo-conectivo de la pared uterina.

Afectación Ganglionar: Los vasos linfáticos son las vías más importantes de diseminación del cáncer de cérvix. Los grupos linfáticos se han agrupado en dos estaciones; la primaria formada por los parametriales, paracervicales, hipogástricos, obturadores e ilíacos externos; la secundaria formada por los sacros, los ilíacos primitivos, los aórticos y los inguinales. Ciertas características del tumor van a condicionar claramente la aparición de metástasis ganglionares, las más importantes y sin actuar ninguna de forma aislada, son: tamaño tumoral, grado de diferenciación, grado de afectación cervical en profundidad y afectación del espacio linfovascular; y a medida que aumenta el tamaño tumoral también lo suele hacer el grado de invasión cervical y la afectación del espacio linfovascular (42).

La relación existente entre el tamaño tumoral y por tanto la afectación del espacio linfovascular, con la presencia de metástasis ganglionares ha hecho que la clasificación de la FIGO contemple el tamaño tumoral. Parece ser que el tamaño tumoral por encima de 4 cm aumenta la probabilidad de afectación ganglionar, por lo que podría tomarse como punto de corte (“cut-off”) (42).

Metástasis ováricas: El carcinoma de cérvix rara vez metastatiza a los ovarios; según una serie del GOG (Gynecologic Oncology Group) en estadios IB el porcentaje de extensión ovárica es del 0.5% para los escamosos y asciende al 1.7% en los adenocarcinomas (43). En pacientes jóvenes será de elección preservar los ovarios, siempre que no se aprecie enfermedad avanzada. Las metástasis ováricas no son tan raras cuando el tumor está muy extendido y existe afectación peritoneal de la enfermedad (44).

Afectación peritoneal: En los tumores cervicales es muy rara la presencia de citología tumoral positiva en ausencia de afectación peritoneal masiva. La presencia de celularidad positiva para tumor en el lavado peritoneal es evidencia de afectación peritoneal, aunque presenta muchos falsos positivos ante la agresividad del procedimiento en si, por lo que se ha descontinuado su práctica habitual (45).

Metástasis a Distancia: Grandes series encuentran afectación pulmonar en el 25.1%, hepática en el 18.7% y ósea en el 15.7% (46).

Los principales tipos histológicos de carcinoma infiltrante reconocidos por la OMS son: el carcinoma epidermoide, el adenocarcinoma y el adenoescamoso.

El tipo histológico más frecuente de carcinoma infiltrante de cérvix es el carcinoma epidermoide (aprox. 80%), éste a su vez se clasifica en 3 grandes grupos (Tabla nº2)

El segundo tipo más frecuente es el adenocarcinoma (15-25%), y dentro de éste grupo el tipo más frecuente es el adenocarcinoma mucinoso endocervical. Por último, existen otras categorías de carcinomas menos frecuentes que no entran dentro de la clasificación de los carcinomas epidermoides ni de los adenocarcinomas (Tabla nº2)

La incidencia del adenocarcinoma infiltrante del cérvix uterino ha ido aumentando en los últimos 20 años en los países occidentales. Las dos principales razones que explicarían este incremento son la infección por el HPV y el uso de anticonceptivos orales (47). La mayoría de los estudios epidemiológicos sugieren que existe un riesgo aumentado de presentar un adenocarcinoma infiltrante de cérvix en mujeres que toman anticonceptivos orales, aunque hay estudios que indican que este riesgo pudiera estar presente sólo para determinados tipos de adenocarcinoma (por ejemplo, adenocarcinoma villoglandular).

Tabla n°2. Tipos histológicos de carcinoma infiltrante del cérvix uterino

Carcinoma epidermoide:

- Queratinizante de célula grande
- No queratinizante de célula grande
- No queratinizante de célula pequeña:
- Basaloide
- Verrucoso
- Condilomatoso
- Papilar
- Tipo linfoepitelioma
- Escamoso transicional

Adenocarcinoma:

- Adenocarcinoma mucinoso:
 - Endocervical
 - Intestinal (enteroide)
 - Células en anillo de sello
 - Desviación mínima
 - Villoglandular
- Adenocarcinoma endometrioide
- Adenocarcinoma de células claras
- Adenocarcinoma seroso
- Adenocarcinoma mesonéfrico

Otros:

- Carcinoma adenoescamoso
- Carcinoma con células en vidrio esmerilado (*glassy cell*)
- Carcinoma adenoide quístico
 - Carcinoma adenoide basal
- Carcinomas neuroendocrinos:
 - Carcinoide
 - Carcinoide atípico
 - Carcinoma de células pequeñas
 - Carcinoma neuroendocrino de célula grande
- Carcinoma indiferenciado

2.4 CUADRO CLINICO Y DIAGNOSTICO:

CUADRO CLINICO

El carcinoma infiltrante de cérvix no suele causar síntomas en los estadios precoces de la enfermedad; la mayoría de las veces los síntomas se producen cuando el estadio es muy avanzado; el 30% de pacientes que se diagnostican en estadios III y IV no presentan síntomas más allá de 3-4 meses.

En las fases iniciales, cuando se presentan síntomas, suele ser leucorrea debido a la atipia epitelial, o sangrado postcoital (coitorragia) que es el síntoma más frecuente de las enfermas que visitan al ginecólogo.

Posteriormente se produce metrorragia, usualmente como sangrados puntuales intermitentes (spotting). El dolor en el bajo abdomen y en la zona presacra es signo de que el tumor ha alcanzado en su extensión la pared pélvica y que afecta a ganglios que producen irritación del plexo presacro. El dolor en los flancos y en la zona lumbar suele ser secundario a la compresión por la masa tumoral de uno o ambos uréteres, con el resultado de hidronefrosis. La invasión de la vejiga o del recto causa con frecuencia disuria y hematuria o diarrea y rectorragia respectivamente. El edema en extremidades inferiores resulta del bloqueo del sistema de drenaje linfovenoso por la afectación del mismo, ocurre en recidivas o en estadios muy avanzados de la enfermedad (48,49).

DIAGNOSTICO

La manera más adecuada de diagnosticar de forma precoz un carcinoma de cérvix es mediante los procedimientos de screening exploratorio y citológico a que son sometidos los grupos poblacionales de mujeres dentro de la revisión ginecológica de rutina.

Existen diversas recomendaciones sobre el inicio, frecuencia y término de los procedimientos de screening (50-52).

La *American Cancer Society* (ACS), La *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* (ASCCP), y La *American Society for Clinical Pathology* (ASCP), en su recomendación en el año 2012 (50,51), sugieren el inicio de screening a toda mujer con vida sexual activa a partir de 21 años con test citológicos obtenidos por el procedimiento de Papanicolaou, por periodos de cada tres años tras 2 resultados negativos consecutivos (no existe aún suficiente evidencia para prolongar el intervalo). A partir de los 30 años, se recomienda un “co-testing” (citología y prueba del HPV) cada 5 años; no recomiendan los test serológicos de HPV solos, o en su defecto citología sola cada 3 años (aceptable). El uso de las vacunas disponibles no significa un screening diferente: la recomendación a éste grupo es el mismo que a la población general.

El screening cesa a los 65 años con una historia negativa o tras histerectomía total, es así que las mujeres mayores de 65 años de edad con una historia de cribados previos negativos y sin antecedentes de un CIN2 o mayor en los últimos 20 años, no deberán ser examinadas para cáncer de cuello uterino con cualquier modalidad. Una vez que el cribado se interrumpe no se debe reanudar, incluso si una mujer reporta que tienen una nueva pareja sexual. Para aquellas mujeres mayores de 65 años con un historial de CIN2, CIN3 o adenocarcinoma in situ, recomiendan que después de una regresión espontánea o tras el tratamiento adecuado de CIN2, CIN3 o adenocarcinoma in situ, la detección de rutina deberá continuar al menos 20 años (incluso si esto se extiende más allá de la detección de 65 años) (50).

Actualmente, la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), limita los procedimientos para el diagnóstico a la colposcopia, biopsia, conización del cérvix, cistoscopia y rectosigmoidoscopia (53, 54).

Los procedimientos radiológicos y quirúrgicos más complejos no se contemplan en la clasificación de la FIGO, sin embargo el uso de la Tomografía Axial Computerizada (TAC), la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), y de la Tomografía con Emisión de Positrones con 18-Fluoro-Desoxi-Glucosa (18-FDG-PET-TAC), y los hallazgos quirúrgicos se suelen utilizar a menudo para diseñar las opciones de tratamiento (54,55).

2.5 ESTUDIO DE EXTENSIÓN - ESTADIAJE

Después de diagnosticarse un carcinoma de cérvix, debe realizarse el estudio de extensión, para determinar si el tumor esta limitado al cuello uterino o se extiende más allá de éste y así conocer el estadio de la enfermedad, y poder planificar el tratamiento.

Luego de realizar una exploración física general minuciosa con especial atención a las áreas supraclaviculares, el abdomen y una exploración ginecológica exhaustiva, se realizarán pruebas de imagen tales como una TAC abdomino-pélvica y una radiografía de tórax. Se ha empezado a utilizar la RMN pélvica y la 18-FDG-PET-TAC no solo para la estadificación de la enfermedad, sino también como herramientas útiles en la planificación del tratamiento radioterápico.

En los casos de carcinoma infiltrante, se debe realizar a las pacientes una evaluación de sangre periférica completa, incluyendo hemograma, perfil bioquímico sérico, creatinina, ácido úrico, función hepática y un análisis de orina.

Los dos sistemas utilizados para clasificar por estadios al cáncer de cuello uterino son el sistema de la FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) y el sistema TNM de la AJCC (American Joint Committee on Cancer), ambos son muy similares. Los ginecólogos y los oncólogos ginecológicos usan el sistema de la FIGO, pero el sistema de la AJCC se incluye para proveer una información más completa.

La clasificación de la FIGO (Tabla nº3) es eminentemente clínica y no tiene en cuenta si existe afectación ganglionar. El sistema de la AJCC clasifica el cáncer de cuello uterino basándose en tres factores: el alcance del cáncer (Tumor), propagación a los ganglios linfáticos (Nódulos), y propagación a órganos distantes (Metástasis). El sistema de la AJCC descrito en la Tabla nº4 es el más reciente, y entró en vigor en enero de 2010.

El sistema de la AJCC clasifica la enfermedad en estadios de 0 a IV. La clasificación por estadios se basa en los hallazgos clínicos en lugar de los hallazgos quirúrgicos, esto significa que la extensión de la enfermedad se evalúa por medio del examen físico y algunas otras pruebas que se realizan en algunos casos, tales como la cistoscopia y la rectosigmoidoscopia (pacientes con estadio IIB o superior, o con estadios menores y con un historial de trastornos del tracto urinario o gastrointestinal inferior, así como en aquellas con tumores bulky). La gammagrafía ósea está indicada sólo si hay sospecha clínica de afectación ósea.

Los estadios de la FIGO son los mismos que los estadios de la AJCC, excepto el estadio 0, que no existe en el sistema de la FIGO.

Tabla n°3. Sistema de Estadificación de la FIGO para el carcinoma de cérvix, 2008

Estadio I: El carcinoma esta estrictamente confinado al cérvix

IA: Carcinoma invasivo pre-clínico, sólo diagnosticado microscópicamente, con una invasión en profundidad $\leq 5\text{mm}$ y con una extensión horizontal $\leq 7\text{mm}$.

IA1 Invasión del estroma no mayor a 3 mm de profundidad y $\leq 7\text{ mm}$ de crecimiento horizontal.

IA2 Invasión del estroma mayor de 3 mm pero menos de 5 mm de profundidad y $\leq 7\text{ mm}$ de crecimiento horizontal

IB: Lesión confinada al cérvix clínicamente visible o lesión microscópica mayor que IA*

IB1 Lesión clínicamente visible de $\leq 4\text{ cm}$ de dimensión máxima.

IB2 Lesión clínicamente visible $>4\text{ cm}$ de dimensión máxima.

Estadio II: Carcinoma de cérvix que invade más allá del útero, pero no la pared pélvica ni el tercio inferior de la vagina.

IIA Sin invasión del parametrio

IIA1 Lesión clínicamente visible de $\leq 4\text{ cm}$ de dimensión máxima.

IIA2 Lesión clínicamente visible $>4\text{ cm}$ de dimensión máxima

IIB Con invasión del parametrio

Estadio III: Carcinoma de cérvix que se extiende a la pared pélvica y/o tercio inferior de la vagina y/o causa hidronefrosis o riñón no funcionante.

IIIA Carcinoma de cérvix que se extiende al tercio inferior de la vagina pero sin extenderse a la pared pélvica.

IIIB Extensión a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o riñón no funcionante**

Estadio IV: Tumor que se encuentra fuera de la pelvis verdadera o con infiltración de la mucosa de la vejiga o recto (probado por biopsia) o metástasis a distancia.

La presencia de edema “bulloso” no constituye por si sólo un criterio para clasificarlo como estadio IV.

IVA Extensión a órganos adyacentes.

IVB Extensión a órganos a distancia.

*Todas las lesiones macroscópicamente visibles, aún con invasión superficial, se asignan a carcinomas estadio IB. La invasión se limita a una invasión del estroma medido con una profundidad máxima de 5mm y una extensión horizontal de no $>7\text{ mm}$. La profundidad de invasión no debería ser $>5\text{mm}$ desde la base del epitelio del tejido original, superficial o glandular.

**En el examen rectal, no hay un espacio libre entre el tumor y la pared pélvica. Todos los casos con hidronefrosis o riñón no funcionante se incluyen, a menos que se sepa que son debidos a otra causa.

Tabla n°4. Sistema de Estadificación de la AJCC para el cancer de cérvix 2010

Extensión del tumor (T):

Tis: las células cancerosas sólo se encuentran en la superficie del cuello uterino sin invadir los tejidos más profundos. (Tis no está incluida en el sistema FIGO).

T1: el cáncer puede estar creciendo hacia el cuerpo del útero, aunque no ha crecido fuera del útero.

T1a: existe una cantidad muy pequeña de cáncer que sólo se puede observar con un microscopio.

T1a1: el área de cáncer es de menos de 3 mm de profundidad y de menos de 7 mm de ancho.

T1a2: el área de invasión del cáncer es entre 3 mm y 5 mm de profundidad y de menos de 7 mm de ancho.

T1b: esta etapa incluye los cánceres de etapa I que se pueden ver sin un microscopio.

(Incluye también los tumores que se pueden ver solamente con un microscopio y que se han propagado a más de 5 mm de profundidad dentro del tejido conectivo del cuello uterino o que tienen más de 7 mm de ancho).

T1b1: tumor <4 centímetros

T1b2: tumor \geq 4 centímetros.

T2: el cáncer ha crecido más allá del cuello uterino y el útero, pero no se ha propagado a las paredes de la pelvis o a la parte inferior de la vagina.

T2a: el cáncer se ha propagado a los 2/3 superiores de la vagina.

T2a1: el cáncer se puede ver, tumor < 4 centímetros

T2a2: el cáncer se puede ver, tumor \geq 4 centímetros.

T2b: el cáncer se ha propagado a los tejidos adyacentes al cuello uterino (parametrios).

T3: el cáncer se ha propagado a la parte inferior de la vagina o a las paredes pélvicas. El cáncer puede estar produciendo hidronefrosis.

T3a: el cáncer se ha propagado al tercio inferior de la vagina, pero no a las paredes pélvicas.

T3b: el cáncer ha crecido hacia las paredes de la pelvis y/o está produciendo hidronefrosis.

T4: el cáncer se propagó a la vejiga o al recto o crece fuera de la pelvis.

Propagación a los ganglios linfáticos (N):

NX: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos cercanos.

N0: no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes.

N1: el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos.

Propagación distante (M):

M0: el cáncer no se ha propagado a otros ganglios linfáticos, órganos o tejidos distantes.

M1: el cáncer se propagó a órganos distantes, a los ganglios linfáticos fuera de la pelvis, y/o al peritoneo.

Respecto a los estudios de imagen, hasta los años 80 la linfangiografía se utilizaba para evaluar la afectación ganglionar de los ganglios pélvicos y para- aórticos, por desgracia los ganglios obturadores e hipogástricos no son opacificados en la linfangiografía (56). En el estudio de Heller y col. (GOG 63), se comparó la fiabilidad de la linfografía, la TAC y la ecografía en la detección de ganglios para-aórticos en pacientes con estadios IIB, III y IVA, y se demostró que la exploración más fiable era la linfografía (sólo un 6% de falsos negativos en el estadio IIB) (57), sin embargo ésta prueba se ha dejado de utilizar debido a que requiere mucho tiempo en la preparación de las pacientes respecto al contraste, además de personal muy especializado para su interpretación.

La RMN ha demostrado ser la mejor técnica de imagen para evaluar la extensión extracervical del tumor primario (permite conocer con mayor precisión la afectación del parametrio, la penetración del tumor en la profundidad del estroma, la afectación del cuerpo uterino, la relación con órganos vecinos) (58). La precisión de la RMN respecto al tumor primario es de 80 % a 90 % en comparación con 60 % a 69 % de la TAC, además la RMN es muy útil en las pacientes alérgicas al material de contraste yodado o con insuficiencia renal, aunque es algo más costosa que la TAC.

La 18-FDG-PET-TAC es una técnica de imagen diagnóstica funcional, metabólica, y no puramente anatómica; se ha estudiado ampliamente su uso en los tumores sólidos, Wong y col. (59) utilizaron ésta técnica en el análisis de una serie de pacientes con carcinoma de cérvix, concluyeron que la PET –TAC fue capaz de detectar el 100 % de la enfermedad primaria, además de separar la población con enfermedad limitada de aquella con metástasis.

Posteriormente el valor clínico de la 18-FDG-PET-TAC en cuanto a la detección del tumor primario, se investigó en un estudio prospectivo por Loft y col. (60), en una serie de 120 pacientes con carcinoma de cérvix, ésta técnica tuvo un valor predictivo positivo del 75%, un valor predictivo negativo del 96%, una sensibilidad del 75% y una especificidad del 96%; sin embargo en los estadios IA y IB, la PET TAC informó falsos negativos con mayor frecuencia, debido a la baja sensibilidad de ésta prueba en tumores con un tamaño inferior a 1cm.

Aún así, ni la 18-FDG-PET-TAC ni la TAC son métodos eficaces para la detección de la extensión del tumor primario al parametrio (61); por tanto en la estadificación inicial del tumor primario, la RMN sigue siendo la mejor técnica de imagen (62).

En cuanto a la detección de los ganglios linfáticos afectados por el cáncer de cérvix, la TAC tiene una sensibilidad del 44% y una especificidad del 93% (63), y ha sido una herramienta de gran valor en la planificación y aplicación tanto de la radioterapia externa como de la radioterapia endocavitaria. La capacidad de la detección de metástasis en los ganglios linfáticos mediante la TAC o RMN depende principalmente del tamaño de los ganglios linfáticos. Se admite que el tamaño de un ganglio linfático de más de 1 cm de eje corto, se considera anormal. La sensibilidad de la RMN respecto a la detección de ganglios linfáticos es de 38-89 % y la especificidad de 78-99 % (64).

Es importante resaltar que cuando se produce la afectación de los ganglios para-aórticos por el tumor, el pronóstico de las pacientes se agrava aún más (65), sin embargo el beneficio de la evaluación y disección quirúrgica de los ganglios linfáticos para-aórticos antes del tratamiento, en las mujeres con carcinoma de cérvix localmente avanzado (CCLA) sigue siendo tema de debate; sin consenso actual en la bibliografía internacional.

En una reciente publicación de la Cochrane (66), se trató de comparar la estadificación quirúrgica de los ganglios linfáticos para-aórticos y la estadificación clínica mediante técnicas radiológicas (TAC o RMN) en mujeres diagnosticadas de CCLA; mediante la revisión de ensayos randomizados, pero sólo encontraron que un ensayo cumplía con los criterios de inclusión de los autores, en aquel ensayo (67) la clasificación clínica parecía prolongar significativamente la supervivencia global y libre de progresión, en comparación con la estadificación quirúrgica; sin embargo esta conclusión se basa en el análisis de un pequeño ensayo individual y por lo tanto la decisión de ofrecer una evaluación quirúrgica pre-tratamiento de los nódulos linfáticos para-aórticos en el CCLA debería ser individualizada.

Rose y col. (68), realizaron un estudio prospectivo para evaluar el beneficio del uso de la PET-TAC en la detección de metástasis ganglionares para-aórticas, en pacientes con CCLA quienes no tenían evidencia de enfermedad extrapélvica antes de ser sometidas a la linfadenectomía de estadiaje. Se estudiaron 32 pacientes con enfermedad localmente avanzada, 6 de 8 pacientes con metástasis en los ganglios para-aórticos tenían evidencia en la PET de afectación metastásica en las para-aórticas.

Nayaran y col. (69), evaluaron si la PET-TAC o la RMN podrían evitar la necesidad de una estadificación quirúrgica ganglionar en las pacientes con CCLA, previo al tratamiento radioterápico. Los hallazgos por imagen se compararon con la clasificación quirúrgica en cuanto a la afectación ganglionar pélvica, la PET tuvo una sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo de 83%, 92%, 91% y 85%, respectivamente, con 88% de seguridad diagnóstica; la RMN detectó sólo el 50% de las pacientes con enfermedad ganglionar pélvica confirmada. La PET detectó 4 de 7 casos con afectación para-aórtica confirmada (todos los sitios confirmados histológicamente y no visualizados en la PET fueron <1cm); los autores concluyeron que el valor predictivo positivo de la PET en la pelvis y en la región para-aórtica, parece ser suficiente para evitar el muestreo ganglionar linfático, pero el muestreo sigue siendo necesario para excluir la enfermedad de pequeño volumen (<1cm) en localización craneal a los sitios de anormalidad en la PET.

En la literatura, al comparar entre la PET-TAC, la TAC y/o RMN, se ha reportado que la sensibilidad de la PET-TAC en cuanto a la detección de la afectación ganglionar pélvica y para-aórtica es significativamente mayor (68-70). Es así que según una revisión de 15 estudios publicados entre 1996 y 2003, la especificidad y sensibilidad de la PET-TAC para detectar metástasis en ganglios para-aórticos es de 0.84 (95% IC 0.68-0.94) y 0.95 (95% IC 0.89-0.98) respectivamente, mientras que la sensibilidad y especificidad para detectar metástasis en ganglios pélvicos es de 0.72 (95% IC 0.53-0.87) y 0.96 (95% IC, 0.92-0.98) (71). La inferioridad de la RMN respecto a la PET-TAC en la detección de metástasis ganglionares ha sido confirmada en el estudio prospectivo de Choi (72).

Debido a la superioridad de la PET-TAC respecto a la RMN y/o TAC en la detección de la metástasis ganglionar, los Centros de Asistencia Médica en Estados Unidos, han determinado la instauración como cobertura nacional el pago de la PET-TAC como prueba de detección de metástasis pre-tratamiento (estadiaje), en los casos de cáncer de cérvix recientemente diagnosticados, después de que una prueba convencional de imagen resulte negativa para metástasis extrapélvica (73).

Aunque es necesario recordar que la PET-TAC tiene un valor limitado en los estadios precoces del carcinoma de cérvix y no debería sustituir a la exploración quirúrgica de los ganglios linfáticos de la pelvis. Sin embargo en aquellas pacientes con enfermedad avanzada (FIGO \geq IB2), la PET-TAC tiene un gran potencial para detectar metástasis en los ganglios linfáticos no sólo dentro de la pelvis, también fuera de ella, más concretamente en la zona para- aórtica, además la PET-TAC puede mostrar metástasis a distancia, ignorada por los exámenes tradicionales como la TAC y la RMN.

2.6 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CÉRVIX

Tratamiento de la enfermedad localmente avanzada

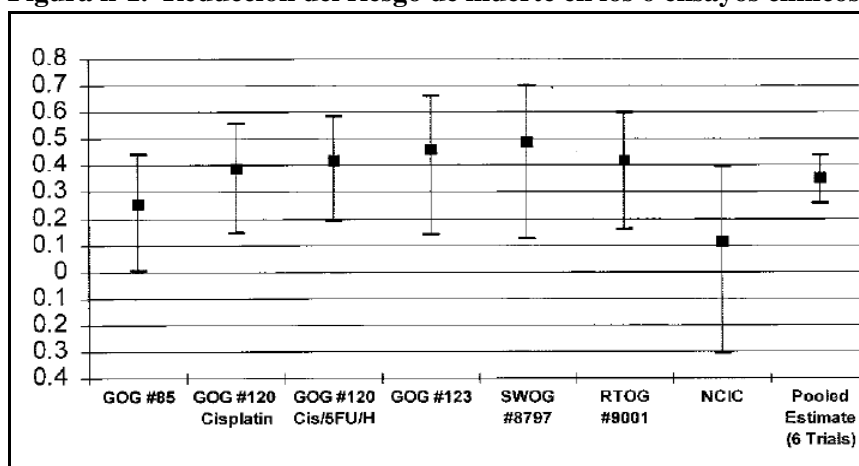
En el periodo previo al uso de la radio-quimioterapia concurrente, con la finalidad de disminuir las altas tasas de recidivas pélvicas en los casos localmente avanzados, se realizaron una serie de ensayos clínicos que utilizaron la quimioterapia de forma neoadyuvante, con la intención de mejorar el control local tumoral y la enfermedad microscópica a distancia que pudiera situarse fuera del campo de radiación, sin embargo aquellos ensayos randomizados que utilizaron la quimioterapia neoadyuvante y radioterapia secuencial versus radioterapia sola como brazo control no encontraron beneficio alguno a favor de la quimioterapia neoadyuvante (74-78). Al analizar estos ensayos, se objetivaron menores tasas de supervivencia y menor control local, por lo tanto se concluyó que la quimioterapia neoadyuvante podría tener un efecto deletéreo en la supervivencia respecto al uso de la radioterapia sola, tras objetivarse la baja tasa de respuestas completas, debido al aumento de la repoblación celular tumoral al comenzar de forma tardía la radioterapia (79).

Fue entonces que el 23 de febrero de 1999, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, EEUU) dio una alerta clínica en la práctica oncológica, apoyada en la mejoría significativa tanto de la supervivencia libre de progresión (SLP) y de la supervivencia global (SG), cuando la quimioterapia basada en cisplatino se administró de forma concurrente a la radioterapia externa en los distintos estadios del carcinoma de cérvix, esta alerta clínica expuso las conclusiones de cinco ensayos clínicos randomizados fase III (80-84). Estos cinco ensayos clínicos (GOG-85, RTOG-9001, GOG-120, GOG-123 y SWOG-8797), con aproximadamente 1.800 pacientes objetivaron una mejoría en la supervivencia en un 30 a 50%, cuando la quimioterapia basada en cisplatino se administró simultáneamente con la radioterapia.

Tuvo lugar en ese entonces, un sexto ensayo clínico (85), patrocinado por el Instituto Nacional del Cáncer de Canadá (NCIC), el cual comparó el uso de la quimioterapia basada en cisplatino concurrente a radioterapia versus radioterapia sola en pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado (CCLA), en aquel ensayo la supervivencia no fue significativamente diferente a 3 y 5 años (69 vs. 66%, 62 vs 58% respectivamente).

Lo crucial fue reconocer que cuando se agruparon los resultados de estos 6 ensayos clínicos, incluyendo el realizado por el NCIC, la reducción en el riesgo estimado de muerte fue del 36% lo cual estuvo dentro del 95% del intervalo de confianza del estudio canadiense (Figura nº 1).

Figura n°1. Reducción del riesgo de muerte en los 6 ensayos clínicos



Reducción en el riesgo de muerte (1- riesgo relativo) de 6 ensayos clínicos de radio-quimioterapia en el cáncer de cérvix ■, Riesgo de reducción --, 95% intervalos de confianza. Abreviaciones: Cis- cisplatino, 5FU fluoracilo, SWOG Southwest Oncology Group, H- hidroxiurea.

Además estos ensayos (80-84) demostraron una mejoría en el control de la enfermedad pélvica, incluso el ensayo canadiense objetivó una reducción relativa del 22% en la recurrencia local en aquellas pacientes que recibieron quimioterapia basada en cisplatino concurrente a radioterapia. En síntesis, una disminución en la recidiva pélvica fue observada en los 6 ensayos clínicos, en conjunto esto representó una reducción del fracaso pélvico de 12,4% (OR 0.51, IC 95%, 0,42 a 0,63).

Por lo tanto los 6 ensayos clínicos apoyaron la mejoría en el control local, SG y SLP, al utilizar el tratamiento concurrente basado en cisplatino, y aunque el ensayo canadiense no logró demostrar diferencias significativas en la SG y SLP, sus resultados favorecieron ligeramente al brazo experimental; desde entonces esta modalidad combinada se ha convertido en el tratamiento estándar del CCLA.

Tradicionalmente el CCLA se consideraba a aquel grupo de pacientes con estadios FIGO IIB-IVA, sin embargo debido a que se observó que los tumores IB-IIA bulky tratados inicialmente con cirugía radical requerían un posterior tratamiento adyuvante, por su alto riesgo de recurrencia y que la modalidad combinada (cirugía, radioterapia y quimioterapia) no mostraba una clara evidencia de beneficio terapéutico en comparación con la modalidad combinada de radio-quimioterapia (84,86,87), el GOG (Gynecologic Oncology Group) incluyó a los tumores IB-IIA bulky dentro del grupo de tumores localmente avanzados.

Entonces aquellas pacientes que se someterán a ésta modalidad de tratamiento combinado, el volumen al cual se entregará el tratamiento radioterápico es crítico y debe estar guiado por la evaluación previa no sólo de la enfermedad primaria sino también de la posible enfermedad ganglionar pélvica y/o para-aórtica.

En el carcinoma de cérvix estadio FIGO IB2 la probabilidad de metástasis ganglionar para-aórtica es alrededor del 6% (83), en el estadio IIB es 19%, y en el estadio IIIB es 29% (57,83), por lo tanto se recomiendan estudios de imagen a partir de estadios \geq IB2. La estadificación quirúrgica ganglionar es también una opción (ejm. disección ganglionar extraperitoneal o laparoscópica), pues puede detectar enfermedad ganglionar microscópica que no es apreciada en las pruebas de imagen (88). Se podría decir que la estadificación quirúrgica antes del tratamiento, es el método más preciso para determinar la extensión de la enfermedad (89); sin embargo puesto que existen pocos indicios que demuestren una mejor SG al utilizar la estadificación quirúrgica de rutina, el NCI recomienda que ésta se deberá realizar sólo en aquellas pacientes con estudios de imagen negativos para enfermedad metastásica, y en el caso que se detectasen ganglios anormales por TAC u otras prueba de imagen, la aspiración con aguja fina deberá ser negativa antes de realizar un procedimiento quirúrgico de estadificación (90).

La Radioterapia de haz externo (RHE)

El tumor primario y los ganglios linfáticos regionales en riesgo son tratados con radioterapia externa definitiva a una dosis estándar de 45-46Gy (a un fraccionamiento de 1.8Gy/día o 2Gy/ día, 5 días a la semana). El volumen de la radioterapia externa dependerá de la afectación ganglionar pélvica y/o para-aórtica, determinado ya sea de forma quirúrgica o por pruebas de imagen, como se describe en párrafos anteriores; posteriormente en el tumor primario se dará una dosis de refuerzo utilizando la braquiterapia.

Actualmente la planificación del tratamiento radioterápico de haz externo (RHE) en 3 dimensiones (3D) basado en el uso de la TAC y la conformación de dosis se considera el estándar (aunque en algunos países en vías de desarrollo, continúan utilizando planificaciones de tratamiento en 2D). Además de la TAC, se utiliza también como ayuda a la planificación del tratamiento la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), ya que es la mejor técnica de imagen para determinar los tejidos blandos y la participación del parametrio en las pacientes con tumores avanzados.

El volumen de la RHE debe cubrir la enfermedad macroscópica, parametrios, los ligamentos uterinos, un margen vaginal suficiente respecto a la enfermedad macroscópica (al menos 3cm), niveles ganglionares presacos y otros volúmenes ganglionares en riesgo. Para las pacientes con ganglios negativos en pruebas quirúrgicas o de imagen, el volumen de radiación debe incluir la totalidad de ilíacos externos, ilíacos internos, presacos hasta S3 y la región obturadora.

Para las pacientes consideradas en alto riesgo de afectación ganglionar (por ejemplo, tumores voluminosos o con ganglios sospechosos o confirmados ubicados en la pelvis verdadera), el volumen de radiación se deberá extender para abarcar también las ilíacas comunes. En las pacientes con documentada afectación ganglionar ilíaca común y/o para-aórtica, se requerirá de la radioterapia pélvica y para-aórtica campo extendido, hasta el nivel del vaso renal izquierdo. La cobertura de enfermedad ganglionar microscópica requiere una dosis RHE de aproximadamente 45-46 Gy, y una dosis adicional de 10 a 15 Gy puede ser considerada para un volumen limitado de ganglios

afectados no resecaos. A su vez la quimioterapia concurrente basada en cisplatino se realizará durante la RHE.

Respecto a la radioterapia campo extendido a para-aórticas (EFRT), en el estudio de Vigliotti y col. (91), 43 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO IB-IV y con metástasis ganglionar para-aórtica confirmada por estadiaje quirúrgico, el tratamiento con EFRT y braquiterapia posterior condujo a un control de la enfermedad por largo tiempo en aquellas pacientes con enfermedad ganglionar de pequeño volumen (<2cm) y por debajo de L3 (la SG a 5 años fue 50% en aquellas con enfermedad microscópica, 33% en aquellas con enfermedad de pequeño tamaño <2cm, y 0-23% en aquellas con metástasis de tamaño moderado a masivo). Aunque en éste estudio no utilizaron quimioterapia concurrente, es obvio el beneficio en la supervivencia. Por otro lado, sólo 8% de las pacientes con linfadenectomía extraperitoneal desarrollaron complicaciones en el intestino delgado vs. 25% con linfadenectomía transperitoneal. La incidencia de obstrucción intestinal fue 8% cuando se entregó una dosis a las para-aórticas de 40-45 Gy, 10% a dosis >45-55Gy y 32% a una dosis >55Gy; sin embargo debemos señalar que en 25 pacientes la RHE fue administrada con un equipo de cobalto y en las 18 pacientes restantes se utilizó un acelerador lineal (2 campos opuestos en 36 pacientes y 4 campos sólo en 7 pacientes). Los márgenes superiores de los campos de tratamiento se extendieron a D12 en 12 pacientes, a L1 en 24 pacientes y a L2 en 7 pacientes, la braquiterapia de baja tasa de dosis (LDR) fue entregada usando radio (la mediana de dosis al punto A fue 95 Gy).

El ensayo multicéntrico del GOG 125 (92) evaluó la viabilidad de la administración de EFRT más quimioterapia concurrente (CDDP 50 mg/m²/día iv y 5FU 1000mg/m²/día x 4 días, semanas 1 y 5 de RHE) y braquiterapia posterior, en 86 pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix con metástasis confirmada en ganglios para-aórticos (estadios FIGO I-IVA); con un seguimiento mínimo de 5 años, 89% completó el tratamiento concurrente, la SG y el ILE (intervalo libre de enfermedad) fue 39 y 34% respectivamente en el total de la muestra. La SG para el grupo con estadio FIGO I fue 50%, para FIGO II fue 39%, para FIGO III-IV fue 38%. La toxicidad aguda gastrointestinal grado 3-4 fue 18.6% y la hematológica fue 15.1%, la toxicidad tardía grado 3-4 fue 14%, principalmente en el recto. Administraron la RHE a la región pélvica y para-aórtica, usando un acelerador lineal mediante 2 campos opuestos AP-PA, dosis de 45 Gy a la región para-aórtica (1.5 Gy/ día, 5 días a la semana), y una dosis suplementaria a la región pélvica mediante campos laterales opuestos (1.8Gy/fx); luego con la braquiterapia LDR se entregó 30-40 Gy al punto A. Por último realizaron un boost parametrial con RHE (dosis en el punto B de 55-60 Gy). La realización de una biopsia en ganglios para-aórticos, mediante aspiración con aguja fina cuando fue posible; una técnica de estadiaje quirúrgico retroperitoneal y un borde superior del campo para-aórtico en L1 en lugar de D10, quizá sean las explicaciones para una morbilidad no muy alta, aunque ésta acaso pudo ser más baja si en lugar de haber realizado una sobreimpresión en parametrios con RHE se hubiese realizado una braquiterapia más conformada y precisa guiada por imagen disminuyendo así la dosis en tejido sano, y del mismo modo tal vez el porcentaje de recurrencias hubiese sido menor

(recurrencia pélvica sola: 20.9%, metástasis a distancia sola: 31.4%, recurrencia pélvica y metástasis a distancia: 10.5%) si hubieran utilizado el CDDP de forma semanal.

En cuanto al uso profiláctico de la radioterapia campo extendido a para-aórticas, el ensayo clínico randomizado controlado de la RTOG-7920 (93) reveló una ventaja en la SG de las pacientes (estadios FIGO IB-IIB) con tumor primario >4 cm y sin evidencia histológica de enfermedad ganglionar según estadiaje; quienes recibieron radioterapia profiláctica campo extendido más braquiterapia, la SG a 10 años en el brazo de radioterapia campo extendido fue 55% vs 44% del brazo de radioterapia pélvica sola ($p=0.02$), si bien es cierto que la toxicidad tardía fue mayor en el grupo radioterapia campo extendido versus radioterapia pélvica sola (toxicidad grado 4-5 fue 8% vs 4% respectivamente), esto en su mayor parte se limitó a las pacientes con cirugía abdomino-pélvica previa. Respecto a éste estudio debemos señalar que la radioterapia fue administrada con un equipo de cobalto y planificación en 2D; con la RHE se administró 30 Gy (campos AP-PA), la pelvis recibió 20 Gy más a través de “campos laterales”, mientras que la región para-aórtica recibió un adicional de 15 Gy a través de campos laterales u oblicuos posteriores”, con la braquiterapia LDR se administró 30-40 Gy al punto A. Aunque en éste estudio no se utilizó quimioterapia concomitante, *en el brazo de radioterapia campo extendido se objetivó una mayor SG respecto a la radioterapia pélvica sola*, según sus autores la probable explicación se debería a una menor incidencia de metástasis a distancia en las respuestas completas y a una mejor tasa de rescates en las pacientes con respuesta completa que fracasaron a nivel local a largo plazo (incidencia acumulada a 5 y 10 años para el primer fracaso a distancia en el brazo campo extendido fue 12% y 16% respectivamente vs 21% y 23% en el brazo pélvico).

Posteriormente Malfetano y col. (94) investigaron la morbilidad y la supervivencia en 67 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix estadios FIGO IIB-IIIB tratadas con radiación profiláctica campo extendido a para-aórticas (sin estadiaje quirúrgico y sin evidencia de afectación para-aórtica en las pruebas de imagen) más CDDP semanal (1mg/kg, máx. 60mg) y posterior braquiterapia; con una media de seguimiento de 47,5 meses, observaron que la toxicidad aguda gastrointestinal fue mínima, ninguna paciente experimentó mielosupresión grado 4, sólo 5 pacientes requirieron transfusión sanguínea previa al tratamiento para obtener una Hb >10gr/dl, sólo 2 pacientes (2.9%) presentaron toxicidad tardía grado 3-4 (fistula recto-vaginal y obstrucción intestinal). Obtuvieron 94% de respuesta completa, 75% de SG; sólo 8 fracasos pélvicos (11.9%) y 7 fracasos a distancia (10.4%). En éste estudio la radioterapia no fue interrumpida en ninguna de las pacientes, la dosis de radioterapia administrada en la pelvis fue 45-50.4Gy a 1.8Gy/fx mediante un acelerador lineal, con campos AP-PA, *los campos fueron reducidos para la región para-aórtica que recibió 45Gy a 1.5Gy/fx (el límite superior se extendió hasta el límite superior de L2)*, con la braquiterapia LDR se administró una dosis de 35-40 Gy al punto A; por tanto éste estudio demostró la capacidad de administrar un tratamiento concomitante a base de cisplatino y radiación campo extendido de forma profiláctica con una mínima morbilidad.

Si bien es cierto que el ensayo clínico randomizado de la RTOG 90-01 (95), el cual comparó la quimioterapia concurrente (CDDP 75 mg/m² iv y 5FU 1000 mg/m²/ día por 4 días, 3 ciclos cada 21 días) a radioterapia pélvica vs. radioterapia pélvica con extensión a para-aórticas (sin quimioterapia) en pacientes con carcinoma de cérvix de alto riesgo (tumores de ≥ 5 cm y/o ganglios positivos) estadios FIGO IB-IVA, objetivó una mejor SG, SLE en el brazo del tratamiento concurrente (73% vs 52% a 5 años; $p < 0.0001$), las toxicidades tardías grado 3-4 en ambos tratamientos fueron similares (13% en el grupo quimio-radioterapia pélvica y 12% en el grupo radioterapia pélvica-para-aórtica). Además sobre éste estudio debemos resaltar *que la quimioterapia no eliminó el riesgo de recurrencia para-aórtica* (7% a 5 años de recurrencia para-aórtica en las pacientes tratadas con quimio-radioterapia pélvica); según sus autores diseñaron éste ensayo sin quimioterapia concurrente en el brazo radioterapia campo extendido; debido a la toxicidad observada en el ensayo clínico Fase II de la RTOG 92-10 (96).

Sin embargo debemos destacar sobre éste último (96), que las pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix con biopsias positivas para metástasis para-aórtica, estadios FIGO I-IV, fueron tratadas mediante un esquema *hiperfraccionado* de 1,2Gy, administrándose una dosis de 48 Gy al campo pélvico y para-aórtico (planificación 2D, mediante 4 campos o 2 campos opuestos AP-PA, límite superior en el interespacio D12-L1), una dosis adicional de 6-10 Gy en los ganglios para-aórticos positivos y una dosis hasta alcanzar 60Gy en los parametrios, y posterior braquiterapia LDR (dosis mínima al punto A de 85 Gy), además de la quimioterapia concurrente (CDDP 75 mg/m² y 5-FU 1,000 mg/m²/24h por 4 días consecutivos, los días 1, 22 y 43; por 2 o 3 ciclos), *como era de esperar las toxicidades fueron altas (agudas: grado 3:27%, grado 4:13%, produciéndose una muerte durante el curso del tratamiento, tardías grado 4:17%), alcanzando bajas tasas de supervivencia (SG estimada a 2 años 46%, a 4 años 29%).*

Aun así existen estudios que han informado sobre perfiles aceptables de efectos secundarios. Kim y col. (97), objetivaron que una dosis alta de 59,4Gy podía ser entregada a los ganglios para-aórticos, sin un aumento adicional en la toxicidad gastrointestinal; a excepción de la hematológica que se autolimitó (9% y 3% de toxicidad gastrointestinal y genito-urinaria aguda grado 3 respectivamente, 6% y 9% de toxicidad gastrointestinal y genitourinaria tardía grado 3), observándose una respuesta completa de 79% en los ganglios para-aórticos a los 3 meses, y una SG y SLE a 5 años de 47 y 42% respectivamente. *La toxicidad no muy alta, probablemente se debió al uso de una planificación conformada 3D (el campo de radiación fue separado según la parte superior para-aórtica y la inferior pélvica; la parte superior recibió 36Gy a 1.8Gy/fx usando campos AP-PA, con un adicional de 9 Gy mediante una técnica de 3 campos, un adicional de 14,4 Gy fue administrado a los ganglios aórticos afectados; y la parte inferior recibió 41,4-50.4 Gy a 1.8Gy/fx a través de una técnica en caja), sin embargo éste estudio tiene como debilidad el uso de diferentes esquemas de quimioterapia (aunque en base a platino) y el ser retrospectivo.*

El papel de la irradiación para-aórtica en las pacientes con ganglios positivos ha producido tasas de SG a 5 años del 31-50% (91, 92,95). Sin embargo, el papel de la irradiación para-aórtica profiláctica sigue siendo controvertido. Varios autores cuestionan el valor de irradiación para-aórtica profiláctica debido a la baja incidencia de fracasos aislados en los ganglios para-aórticos (98), mientras que otros plantean los problemas que puedan surgir debido a las complicaciones tardías por el tratamiento (96, 99-101).

Sin embargo, la irradiación para-aórtica profiláctica podría justificarse por: primero, los ganglios para-aórticos son santuarios de enfermedad metastásica previa a su difusión sistémica; segundo, la incapacidad para detectar con precisión por pruebas de imagen una metástasis para- aórtica subclínica; tercero, el aumento de la morbilidad-toxicidad por la combinación de procedimientos de estadificación quirúrgica y radioterapia posterior; cuarto, la frecuencia relativamente común de la enfermedad dentro de estos ganglios en estadios localmente avanzados, y por último, un número significativo de pacientes que fracasan fuera de los campos convencionales de tratamiento (93,95).

Por otro lado, uno de los principales problemas del uso del tratamiento radio-quimioterápico, es el posible aumento de la toxicidad aguda al utilizar la quimioterapia concurrente, que provocaría una prolongación del tiempo global del tratamiento, permitiendo la repoblación celular tumoral, es por ello que la mayoría de las guías internacionales aconsejan el uso de sólo un quimioterápico (a base de CDDP, por el efecto demostrado en los ya conocidos 5 ensayos clínicos) o como máximo 5-FU asociado (NCCN guidelines), aun así existen diversos ensayos en marcha que evalúan el uso de 2 agentes de forma concurrente a la radioterapia en los casos de CCLA, sin embargo no debemos olvidar que la prolongación del tratamiento radioterápico ha demostrado tener un efecto deletéreo tanto en el control pélvico de la enfermedad como en la supervivencia (102-105).

Es entonces que aparecen nuevas técnicas de tratamiento, buscando una mayor conformidad de la dosis en el volumen blanco y minimizando la dosis recibida en tejido sano, así surge la radioterapia de intensidad modulada (IMRT).

Debido a que las pacientes con CCLA y/o con tumores voluminosos han mostrado una tasa significativa de metástasis en ganglios para-aórticos (57, 83); y además que la principal toxicidad que muestran la mayoría de estudios que utilizaron EFRT (radioterapia a campo extendido) es de tipo intestinal (92,93,95,96), se ha considerado que la IMRT podría utilizarse con éxito para limitar la dosis a intestino, disminuyendo de ese modo la incidencia de toxicidad aguda y tardía, manteniendo el efecto terapéutico beneficioso de la EFRT.

Asimismo, la IMRT no sólo permite que las dosis convencionales de radiación sean entregadas más fácilmente junto a la quimioterapia, sino también permite la escalada de dosis a regiones ganglionares afectas; usando técnicas de radioterapia convencional las dosis en regiones ganglionares involucradas no pueden ser escaladas más allá de 50-55Gy debido a los límites de tolerancia de los tejidos sanos de alrededor.

El incremento de la conformidad de la IMRT permite la escalada de dosis cerca de tejido sano radio sensible. Los grupos de la Universidad de Washington y de Alabama, han demostrado que es posible la escalada de dosis a 60 Gy utilizando la técnica de IMRT (106,107). Ambos grupos utilizaron una técnica de boost simultáneo, entregaron una dosis más alta por fracción a la zona ganglionar afecta, con ello se evita la prolongación del tiempo global de tratamiento y la potencial repoblación tumoral, así como el uso de la ventaja radiobiológica de una mayor dosis por fracción.

Diversos estudios que han utilizado la IMRT han demostrado disminuir la incidencia de toxicidades gastrointestinales y genito-urinarias tanto agudas como tardías (108-112). En el estudio prospectivo de Liang (112), al utilizar la IMRT además de obtener bajas tasas de toxicidad en el global de la muestra; al comparar el brazo de EFRT en pacientes sin afectación ganglionar vs EFRT en pacientes con afectación ganglionar, se observó un beneficio en el primer grupo respecto a la SG, SLE y supervivencia libre de metástasis a distancia (SLMD) (87 vs 62%, 82 vs 54 %, y 79 vs 54% respectivamente).

La Braquiterapia (BQT)

La braquiterapia es una parte crítica del tratamiento para todas las pacientes con cáncer de cuello uterino intacto. Esta se realiza por lo general con un enfoque intracavitario (con una fuente endouterina y generalmente con 2 fuentes vaginales).

Dependiendo de la anatomía de la paciente y del tumor, la braquiterapia puede ser administrada en la vagina de las pacientes con un cuello uterino intacto utilizando aplicadores ovoides, en anillo, o el cilindro (combinado con el tándem intrauterino). Cuando se combina con la radioterapia de haz externo, la braquiterapia a menudo se inicia hacia la última parte del tratamiento, cuando se ha observado una suficiente regresión del tumor primario que permita la colocación del aplicador de braquiterapia de modo satisfactorio.

En aquellos casos raros, en que la geometría del tumor hace que la braquiterapia intracavitaria sea inviable, las pacientes pueden ser tratadas mediante braquiterapia intersticial; sin embargo tal braquiterapia sólo debe ser realizada por personas y en instituciones con experiencia y conocimientos técnicos adecuados.

Los parámetros históricos de dosificación más comunes en la braquiterapia han utilizado un sistema que incluye una dosis específica en el punto A (definido como 2cm lateral y 2 cm superior al cérvix) y que incorpora determinadas directrices para la “carga de la fuente radiactiva y la distribución de la actividad entre el útero y la vagina”, en base a consideraciones anatómicas.

Los esfuerzos actuales de “la braquiterapia guiada por imagen 3D”, tratan de optimizar la cobertura de dosis-implante al tumor, mientras que potencialmente reducen la dosis a los órganos adyacentes (vejiga, recto, sigma, asas intestinales) (113). Aun así, el peso de la experiencia, los resultados en el control tumoral, y la práctica clínica más continua, se han basado en el sistema de puntos de dosificación (punto A) (114).

Las recomendaciones de dosis al punto A establecidas en las guías de la NCCN, se basan en la ampliamente validada y tradicional dosis fracción de braquiterapia a baja tasa de dosis (LDR). Para la braquiterapia LDR, la dosis al punto A asume una administración de 40 a 70 cGy/h. Los médicos que utilizan braquiterapia de alta tasa de dosis (HDR) dependerán de la ecuación del modelo lineal-cuadrático para convertir la dosis nominal al punto A/(HDR) a una dosis al punto A/(LDR) biológicamente equivalente (<http://www.americanbrachytherapy.org/guidelines/>).

La segunda parte de las recomendaciones del grupo de trabajo GYN GEC ESTRO, se refiere a los parámetros de dosis-volumen para la braquiterapia 3D en el cáncer de cérvix. (recomendaciones para el período de transición de lo tradicional a la braquiterapia 3D basada en imágenes), se ocupa de aspectos como imágenes en 3D, la física, la radiobiología, la dosis en los puntos de referencia, volúmenes y dimensiones para el GTV y CTV (113). Sin embargo, los conceptos de GTV y CTV de alto riesgo y riesgo intermedio (CTV-HR, CTV-IR) (115) tendrán que ser validados a través de una evaluación prospectiva de la práctica clínica en el uso de imágenes 3D para la planificación del tratamiento.

Cuando se prescribe a un objetivo, la prescripción de dosis es la dosis planeada para cubrir por completo este objetivo tanto como sea posible. La dosis prescrita siempre está relacionada con el blanco, mientras que la cobertura real puede ser evaluada con el uso de parámetros de DVH (histogramas dosis-volumen). Los puntos de normalización y de dosis de referencia son herramientas para la planificación del tratamiento, permiten el logro de ponderaciones de tiempo de permanencia reproducibles y distribuciones de isodosis.

En el reporte ICRU 38 es recomendada una dosis de referencia de 60Gy, aplicada según la clásica braquiterapia LDR (50 cGy/h), ésta es la dosis apropiada para curar la enfermedad microscópica en el cáncer de cuello uterino y corresponde al CTV-IR en el tratamiento definitivo. Actualmente la dosis empleada para curar la enfermedad macroscópica correspondiente al CTV-HR oscila entre 75 y 90Gy EQD2 (Dosis Equivalente Biológica a 2Gy). Por lo tanto, además del volumen de referencia de 60 Gy, niveles más altos de dosis de referencia (por ejemplo, 85Gy EQD2) se han propuesto para el CTV-HR (116).

Con la finalidad de facilitar la comparación, los informes de dosis deberían hacer referencia a la dosis prescrita al blanco basada en imágenes (parámetros de cobertura de la dosis. Tabla nº5) y al sistema tradicional. Los valores de la dosis total deberían ser notificados como dosis física y además como EQD2, indicando el fraccionamiento y la tasa de dosis.

La braquiterapia imagen guiada adaptada (IGABT) para el cáncer de cérvix, utilizando principalmente la RMN, es un método en evolución que se acerca cada vez más a reemplazar el enfoque 2D basado en la radiografía convencional. Durante la complejidad de este procedimiento asistido por imagen, se proporciona la evaluación de la enfermedad, la planificación provisional del tratamiento ("planificación previa"), la colocación del aplicador y su reconstrucción, así como el contorno, la planificación del tratamiento definitivo y el control de calidad de la entrega de dosis.

Con la IGABT se identifican los cambios en la topografía adyacente al aplicador causados por la regresión tumoral, el edema, la dilatación y los propios cambios del órgano blanco. Por lo tanto, el CTV para la IGABT se basa principalmente en el volumen tumoral en el momento de la braquiterapia y tiene en cuenta dominios tanto de tiempo y espacio.

Las incertidumbres durante el proceso de la IGABT están relacionadas con el contorno del GTV-CTV, la reconstrucción del aplicador, así como la variabilidad inter-fracción, intra-fracción e inter-aplicaciones; variabilidad causada por la respuesta tumoral y los cambios del órgano. A diferencia de la RHE donde las incertidumbres de configuración se compensan mediante la adición de un margen al CTV; márgenes en dirección lateral y antero-posterior no pueden ser utilizados para la IGABT (117).

TABLA nº 5. Recomendaciones para el registro y la presentación de informes en braquiterapia ginecológica 3D

Descripción completa de la situación clínica que incluye examen físico, anatomo- patológico e imágenes, dimensiones y volumen del GTV en el diagnóstico y en el momento de braquiterapia, dimensiones y volúmenes del CTV HR y del CTV IR, respectivamente.

Descripción completa de la técnica de imagen 3D y procedimiento de contorno

Descripción completa de la técnica de braquiterapia, isótopo; tipo de fuente; tasa de dosis; tipo de aplicador; tipo de carga diferida (manual o remoto); descripción de las agujas intersticiales adicionales si las hubiera.

Prescripción de tratamiento y planificación del tratamiento, técnica de reconstrucción del aplicador, patrón de carga estándar, método de especificación de dosis; método de optimización, si se aplica.

Dosis prescrita

Total de referencia aire Kerma (TRAK)

Dosis en el punto A (derecha, izquierda, media)

D100, D90 para GTV y CTV-HR y CTV-IR, respectivamente

Dosis a la vejiga y el recto para los puntos de referencia ICRU

D0.1cc, D1Cc, D2cc para los órganos en situación de riesgo (por ejemplo, el recto, sigmoides, vejiga, vagina*)

D5cc, D10cc para los órganos en riesgo si el contorno de las paredes de los órganos es realizado

Descripción completa del patrón de dosis-tiempo: dosis física y dosis biológicamente ponderadas ($\alpha/\beta = 10$ Gy para GTV y CTV; $\alpha/\beta = 3$ Gy para OAR (órganos de riesgo); $T_{1/2} = 1.5$ h para GTV, CTV y OAR)

*Los parámetros de dosis -volumen para la vagina todavía necesitan ser definidos.

Recommendations from gynecological (GYN) GEC ESTRO working group (II): Concepts and terms in 3D image-based treatment planning in cervix cancer brachytherapy—3D dose volume parameters and aspects of 3D image-based anatomy, radiation physics, radiobiology. **Radiotherapy and Oncology** 78 (2006) 67–77

Con la planificación del tratamiento 3D-IGABT se consigue una mejoría significativa de los parámetros DVH, en los tumores pequeños el beneficio se obtiene principalmente por una disminución de la dosis a los OAR próximos, mientras que en los tumores de gran tamaño el uso de técnicas intersticiales complementarias y la optimización pueden duplicar el volumen blanco que puede ser tratado con un nivel de dosis terapéutica.

En la actualidad, las mejoras técnicas han sido principalmente la adaptación de los clásicos aplicadores de braquiterapia a TAC y RMN compatibles, y más recientemente la combinación de la braquiterapia intracavitaria e intersticial.

En el pasado, las mejoras en relación al control loco-regional, control a distancia y la supervivencia, se han logrado a través del uso de la radio-quimioterapia concomitante. Sin embargo, haciendo referencia al meta-análisis del grupo londinense (18 ensayos clínicos, incluyendo los ya cinco conocidos), el beneficio absoluto de la concomitancia es pronunciado pero limitado; lo cual es especialmente cierto para la enfermedad avanzada (118), el beneficio absoluto en la SG, SLE y el control local a 5 años se ha estimado en 6%, 8% y 9%, respectivamente, lo cual está en concordancia con lo demostrado en otros tipos de cáncer, como por ejemplo cabeza y cuello (119). El beneficio absoluto de SG es más grande para la enfermedad limitada (IB/IIA) en 10% y disminuye en estadios más avanzados a 7% para IIB y 3% para III/IVA (118,120). Estos hallazgos implican la necesidad de una mejora adicional, lo cual puede ser posible quizás mediante la introducción de una más intensiva quimioterapia adyuvante (121,122); pero también sin duda, a través de mejoras en la radioterapia externa y braquiterapia; en particular para la enfermedad más avanzada.

Es así que algunas limitadas series mono institucionales, han informado resultados favorables de la combinación de IGABT con la radioterapia conformacional 3D de haz externo \pm quimioterapia (Hospital General de Viena, Instituto Gustave Roussy- París y Tata Memorial-Mumbai, 123-125). La gran serie de Viena publicada en el año 2007, ha desempeñado un papel importante en aclarar la cuestión de la mejora en la adaptación de la dosis al volumen, escalada de dosis y resultados clínicos.

El grupo de Viena (123), presentó los resultados iniciales respecto al impacto clínico de la braquiterapia HDR guiada por imagen (RMN) combinada con la RHE \pm quimioterapia, y la escalada de dosis en pacientes con CCLA. Durante el periodo 1998-2003, 145 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO IB-IVA, fueron tratadas (RHE: 45-50.4Gy a 1.8 Gy/fx, con una de técnica de 4 campos mediante un acelerador lineal), fue prescrita una dosis total de 80-85Gy (EQD2Gy).

El procedimiento de planificación fue empezado con un plan estándar normalizado al punto A. En el período 1998- 2000 (73 pacientes), la adaptación de dosis se basó principalmente en la inspección visual de las líneas de isodosis y los cambios de dosis observados en el punto A. En el período 2001-2003 (72 pacientes) realizaron una optimización manual del tiempo de permanencia basada en el contorno del CTV-HR; el control de los parámetros del DVH [la dosis del CTV-HR fue evaluada en términos de dosis que cubren el 90% del CTV-HR (D90), D2cc en los OAR] y escalada de dosis.

En 29 casos la técnica intracavitaria fue combinada con braquiterapia intersticial. La media de D90 fue 81 Gy y 90 Gy durante el primer y segundo período, respectivamente ($p<0,01$). Con una mediana de seguimiento de 51 meses, la remisión completa actuarial a 3 años de la pelvis verdadera (ccRTP) fue 88%; para los tumores $>5\text{cm}$ fue 71% en el primer periodo y el 90% en el segundo ($p=0,05$). La supervivencia libre de progresión (PFS) actuarial a 3 años de la pelvis verdadera (control local) fue 85% y la PFS de

metástasis a distancia fue 80% en el total del grupo. El control local de los tumores >5cm fue 64% en el primer periodo y 82% en el segundo ($p = 0,09$).

La SG actuarial a 3 años fue 58% y la supervivencia cáncer específica (CSS) fue 68%. La mejoría se produjo sólo en tumores >5 cm; SG 28% vs. 58% ($p = 0,003$); CSS 40% vs. 62% ($p = 0,07$). La morbilidad tardía actuarial a 3 años (LENT SOMA, grados 3 y 4) fue 4% gastrointestinal, 4% urinario y 5% vaginal. La morbilidad tardía gastrointestinal y urinaria (G3/G4) fue 10% en el primer periodo y 2% en el segundo.

Por lo tanto, se puede interpretar que un alto control local se puede lograr con una baja morbilidad, cuando se explota el potencial de la planificación del tratamiento 3D basado en la RMN y una braquiterapia intracavitaria/intersticial combinada, si se requiere.

Posteriormente el mismo grupo, publicó en el año 2011 (126) los resultados de una serie mayor, 156 pacientes con carcinoma de cérvix localmente avanzado (FIGO IB-IVA) tratadas con RHE-3D (45-50.4Gy) \pm quimioterapia (73% recibieron CDDP 40mg/m² semanal) y IGABT (basada en RMN) HDR (4 x 7Gy) durante el periodo 2001-2008. Aplicaron el concepto de CTV-HR (D90) y restricciones en los OAR, el objetivo fue escalar dosis en los tumores grandes (D90 >85Gy), a menudo con la combinación de braquiterapia intracavitaria e intersticial (44%). Las restricciones de dosis-volumen (D2cc) fueron 70-75 Gy para el recto y sigmoide, y 90Gy para la vejiga. El tamaño tumoral fue >5cm en 103 pacientes (66%), 75 pacientes (48%) presentaron afectación de los ganglios linfáticos, la dosis media prescrita (D90) fue 93 ± 13 Gy, D2cc 86 ± 17 Gy para la vejiga, 65 ± 9 Gy para el recto y 64 ± 9 para el sigmoide.

Con una mediana de seguimiento de 42 meses, se objetivó una remisión completa en el 97%. El control local para el total del grupo a los 3 años fue 95%; para los tumores de 2-5 cm fue 98% y para los tumores >5cm fue 92% ($p=0.04$); el 100% para IB, 96% para IIB, 86% para IIIB. La CSS a los 3 años fue 74% en general, 83% para los tumores de 2-5 cm, 70% para los tumores > 5 cm, 83% para IB, 84% para IIB, 52% para IIIB. La SG a los 3 años fue 68% en el total, 72% para los tumores de 2-5 cm, 65% para los tumores > 5 cm, 74% para el IB, 78% para el IIB, 45% para IIIB; en cuanto a la morbilidad tardía (escala LENT-SOMA) observaron eventos G1+G2/G3+G4 $n = 32/3$ en vejiga, $n=14/5$ en recto, en intestino (incluyendo sigmoide) $n=3/0$, y en vagina $n=128/2$ respectivamente.

Al parecer la mejoría del control local tuvo un impacto en la CSS y en la SG, aun así estudios clínicos prospectivos multicéntricos son obligatorios para evaluar los hallazgos de éste estudio mono institucional, por ello está en marcha un ensayo internacional prospectivo multicéntrico sobre la braquiterapia guiada por RMN en el cáncer de cuello uterino localmente avanzado (EMBRACE).

2.7 PREVENCIÓN - VACUNACIÓN:

Las estrategias a futuro para el control del cáncer de cérvix se basan en la prevención; no solo de los factores de riesgo ya descritos en la etiología, también en el avance del conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares responsables de la carcinogénesis y su relación con la infección por el HPV. Por ende, el tratamiento de la enfermedad podría basarse en un futuro próximo, en la regulación génica o de expresión proteica, o modificación de la respuesta inmune humoral o celular para conseguir la prevención de la enfermedad y/o rechazo al tumor.

La vacunación contra el HPV podría tener gran valor en países en vías de desarrollo, debido a su alta incidencia y donde los programas de screening con PAP han sido inefectivos por largo tiempo.

Actualmente están en desarrollo dos tipos de vacunas: profilácticas para prevenir la infección por HPV y consecuentemente los diversos tipos de enfermedades asociadas al virus, y terapéuticas para inducir la regresión de lesiones precancerosas o la remisión de un carcinoma cervical infiltrante (127,128).

Se han desarrollado al menos dos vacunas contra diversos serotipos oncogénicos del HPV; las vacunas Gardasil® y Cervarix® son altamente efectivas contra la aparición de ciertos serotipos de HPV. Por otro lado; se ha hallado evidencia que la vacuna bivalente (Cervarix®) también protege de manera significativa contra otros serotipos oncogénicos del HPV ante los cuales no se desarrolló la vacuna (129).

Actualmente CDC (Centers for Disease Control and Prevention) y el ACIP (Comité asesor sobre prácticas de inmunización) recomiendan en EEUU, la vacunación sistemática con la vacuna tetravalente del HPV (HPV4; Gardasil de Merck & Co. Inc.) a los niños varones entre los 11 o 12 años, siendo recomendable entre 13 y 26 años si no han sido vacunados previamente o no han completado la serie de 3 dosis (130,131).

La vacuna tetravalente se dirige contra los tipos HPV 6, 11,16 y 18 y fue autorizada para su uso en mujeres en Junio de 2006; la vacuna bivalente contra el HPV (HPV2; Cervarix de GlaxoSmithKline) está dirigida contra el HPV 16 y 18, y fue autorizada para su uso en mujeres en Octubre de 2009, el ACIP recomienda cualquiera de las vacunas para su uso rutinario en mujeres de 11 o 12 años.

En el año 2009, la HPV4 fue autorizada para su uso en los varones, para la prevención de las verrugas genitales; y en diciembre de 2010 la FDA añadió la prevención del cáncer anal en hombres y mujeres como una indicación para su uso. Los cánceres asociados al HPV en los hombres incluyen algunos de ano, pene, orofaringe; que son causados principalmente por el HPV 16. Se estima que 22.000 casos de cáncer asociados al HPV 16 y 18 ocurren anualmente en los Estados Unidos, incluyendo un estimado de 7,000 cánceres asociados a VPH 16 y 18 en los hombres.

2.8 FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA DE CÉRVIX

1. EDAD: Se ha postulado que las pacientes más jóvenes (≤ 40 años) presentan un peor pronóstico respecto a aquellas con mayor edad (132-134); la influencia en el pronóstico atribuida a una edad menor, se puede explicar por el análisis de Rutledge y col.(135) quién demostró una interacción entre la edad y el estadio tumoral según la evaluación del riesgo relativo (RR) para 250 pacientes <35 años y sus respectivos controles, aquel estudio observó que las pacientes más jóvenes presentaban estadios tumorales mayores.

2. ESTADO GENERAL (ECOG): Las pacientes ancianas que presentan un mal estado general debido a sus co-morbilidades y al propio tumor (136), e incluso aquellas pacientes jóvenes con un ECOG ≥ 2 tienen una menor probabilidad de respuesta; debido a que no logran alcanzar una óptima adherencia al tratamiento (137)..

3. LA ANEMIA Y LA HIPOXIA TUMORAL: Uno de los factores que desempeña un papel importante en el resultado curativo del tratamiento radioterápico es la hipoxia intratumoral; la radiosensibilidad disminuye rápidamente cuando la pO₂ tumoral es $<25-30$ mmHg (138), se han propuesto varias explicaciones, una de ellas implica el control intratumoral del oxígeno, un potente radiosensibilizador relacionado con la mediación de los daños al DNA (139).

La presencia de oxígeno puede aumentar el daño al ADN a través de la formación de radicales libres hidroxilo oxígeno-derivados, que se producen principalmente después la interacción de la radiación con el agua intracelular (140). Por otra parte, la presencia de oxígeno puede “estabilizar” a los radicales hidroxilos altamente reactivos que causan daños en el ADN, reduciendo así la capacidad de las células tumorales para reparar las cadenas de ADN dañadas (141,142). Debido al “efecto del oxígeno”, la dosis de una sola fracción de radiación ionizante que se requiere para lograr la misma fracción de supervivencia celular, es de dos a tres veces mayor en condiciones de hipoxia que en condiciones de normoxia; en otras palabras, la radioterapia es de dos a tres veces menos eficaz en la destrucción de las células hipóxicas que las células normóxicas (142).

Varios estudios han demostrado que el estado de oxigenación pretratamiento puede predecir la supervivencia global, libre de enfermedad y el control local del tumor en las pacientes con cáncer de cérvix (143-147). En 1993, Höckel y col. reportaron datos respecto a la pO₂ tumoral en las pacientes con carcinoma de cérvix avanzado sometidas a radiación o cirugía (148), los resultados indicaron que un nivel de pO₂ ≤ 10 mmHg discrimina entre los cánceres de cuello uterino hipóxicos y no hipóxicos.

Degner y Sutherland, usando un modelo matemático de oferta de oxígeno y oxigenación del tejido tumoral, demostraron que al aumentar el nivel de hemoglobina en un 20% podría producirse una disminución teórica en el volumen de tejido hipóxico de aprox. 30% (149). Vaupel y col. objetivaron que el nivel óptimo de hemoglobina, respecto al

estado de oxigenación de los tumores ginecológicos es entre 12 y 14 g/dl (150). Aunque está claro que la eritropoyetina humana recombinante (EPO) puede reducir la necesidad de transfusiones en pacientes anémicos con cáncer, su efecto sobre la calidad de vida es menos claro (151); en la actualidad no hay pruebas de que el uso de la EPO sea superior a las transfusiones respecto al impacto en el resultado clínico de los pacientes que reciben radioterapia, y las transfusiones son una opción menos costosa en la mayoría de los casos (152).

4. TAMAÑO-VOLUMEN TUMORAL: Diversos estudios han descrito una relación entre el volumen– tamaño tumoral y la incidencia de recidiva local; metástasis en ganglios pélvicos y en parametrios; además de relacionarse con la supervivencia en las pacientes con carcinoma de cérvix. (153-156). Aun así no existe un claro límite en el tamaño a partir del cual el pronóstico cambie de manera radical. Debido a la observación de que los tumores IB-IIA bulky (>4cm) tratados mediante cirugía radical, requerían un tratamiento adyuvante por el alto riesgo de recurrencia, y que la modalidad combinada (cirugía, radioterapia y quimioterapia) no mostraba una clara evidencia de beneficio terapéutico en comparación con una modalidad combinada de radio-quimioterapia (157,158), el GOG incluyó a los tumores IB-IIA bulky dentro del grupo de tumores localmente avanzados.

5. ESTADIO TUMORAL: Estudios de años previos como los más recientes; continúan objetivando que el estadio tumoral FIGO es el más importante factor pronóstico independiente en las pacientes con CCLA (133,159-161), pues se relaciona con las recidivas pélvicas y la supervivencia a largo plazo.

6. AFECTACIÓN DE GANGLIOS LINFÁTICOS: Se han estudiado diversos factores pronósticos para identificar a las pacientes con un alto riesgo de fracaso a distancia, antes del uso de la radio-quimioterapia concurrente, un estadio FIGO avanzado y un estado ganglionar positivo fueron sugeridos como factores de riesgo para recurrencia a distancia (162,163), así también en la actual era de la radio-quimioterapia se continúa objetivando que el estado de los ganglios linfáticos y el estadio FIGO siguen siendo fuertes factores de riesgo para la recurrencia a distancia (164).

7. INVASIÓN EN PROFUNDIDAD DEL ESTROMA: Existe una estrecha relación entre la profundidad de invasión al estroma y la incidencia de metástasis en los ganglios linfáticos pélvicos y la supervivencia en las pacientes con cáncer de cérvix (154,165); por ello la invasión en profundidad del estroma está presente en la actual clasificación de la FIGO, una invasión mayor a 10mm del estroma confiere un peor pronóstico (166).

8. INVASIÓN VASCULAR (*capillary-lymphatic space invasion*): La invasión de los vasos sanguíneos y linfáticos dan lugar a un mal pronóstico en las pacientes con cáncer de cérvix, más aún en los estadios precoces, pues se ha objetivado que en estos casos la conización o histerectomía simple sin disección ganglionar daría lugar a recurrencias como metástasis en los ganglios pélvicos (167); en los casos de estadio precoz y ausencia de afectación ganglionar, la supervivencia global está relacionada con la presencia de invasión linfovascular (168,169), empero cuando existe afectación

ganglionar o afectación en profundidad del estroma, la invasión linfovascular pierde valor pronóstico independiente (170)

9. TIPO HISTOLÓGICO: Existe controversia en cuanto al tipo histológico como factor pronóstico independiente de supervivencia. Aunque algunos estudios no han mostrado ninguna diferencia en la supervivencia entre adenocarcinomas (ADC) y carcinomas escamosos (SCC) (171-173), algunos han objetivado que el ADC lleva un peor pronóstico con una diferencia de 10-20% en la supervivencia a 5 años (174-176). En estadios clínicos avanzados; la diferencia en la supervivencia entre ADC y SCC es más evidente; cuando comparamos por estadios clínicos, las pacientes con ADC presentan una significativa menor tasa de supervivencia que aquellas con SCC (177,178). También tienen peor pronóstico los carcinomas glassy cell, adenoide quístico, de células pequeñas (indiferenciado) que son los más agresivos.

10. ANTÍGENO DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCC-Ag.): Se ha observado que una elevada cifra sérica del SCC-Ag. después del tratamiento del cáncer de cérvix, se asocia a recurrencia o persistencia de la enfermedad (179,180); aunque en algunos casos esto ha sido cuestionado, sobre todo en relación al costo-efectividad (181,182).

11. ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO: Antes del descubrimiento del antígeno de células escamosas (SCC-Ag), el antígeno carcinoembrionario (CEA) era utilizado como marcador tumoral para controlar la respuesta al tratamiento y recurrencia del cáncer de cérvix (183,184). Niveles elevados de CEA se han observado en aprox. un tercio de pacientes con carcinoma escamoso de cuello uterino, también se ha observado que los niveles de CEA vuelven a la normalidad en aproximadamente el 90% de las pacientes después de la radio-quimioterapia (185,186). En pacientes con CCLA, Chen y col. (186) informaron que un nivel sérico pre tratamiento de CEA > 10 ng/ml pero con un nivel <10 SCC-Ag ng/ml, fue un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad y causa específica en las pacientes sometidas a radio-quimioterapia. Del mismo modo en el estudio de Huang (187); las pacientes con carcinoma escamoso de cérvix tratadas con radio-quimioterapia, el nivel sérico pre-tratamiento de CEA \geq 10 ng/ml fue un factor independiente de fracaso local, metástasis a distancia y supervivencia libre de enfermedad.

12. Se han descrito otros posibles factores pronósticos en el cáncer de cérvix; tales como el índice de recuento apoptótico (188,189); los llamados oncogenes o proteínas reguladoras de la apoptosis y/o supervivencia celular tales como Bax, Bcl-2, p21, p53, c-myc (190-194); además de la expresión de receptores de factores de crecimiento tales como EGFR, c-*erbB*-2, VEGF entre otros (195-197).

3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EN TUMORES SÓLIDOS

El rol de los factores de crecimiento que conducen las vías de señalización en la patogénesis del cáncer humano ha sido establecido desde hace tiempo. Hace más de veinte años, Mike Sporn y Anita Roberts (198) elaboraron la teoría de la secreción autocrina: las células cancerosas exhiben un reducido requerimiento de factores de crecimiento suministrados de forma exógena; para mantener una alta tasa de proliferación. Esta laxitud en la dependencia de los factores de crecimiento, se debe en parte a la habilidad de las células tumorales en producir sus propios factores de crecimiento (199).

El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), es una glicoproteína de 170 kDa, que contiene un dominio extracelular de unión a ligando, una región transmembrana, un dominio intracelular con actividad intrínseca tirosina quinasa, y una cola C-terminal, el EGFR pertenece a la familia erbB/HER, que incluye cuatro miembros definidos como ErbB-1/EGFR/HER1, ErbB-2/HER2/neu, ErbB-3/HER3 y ErbB-4/HER4 (200-202), estos demuestran homología en sus dominios quinasa, pero divergen en sus dominios extracelulares y en las regiones C-terminal (Figura n° 2) (203).

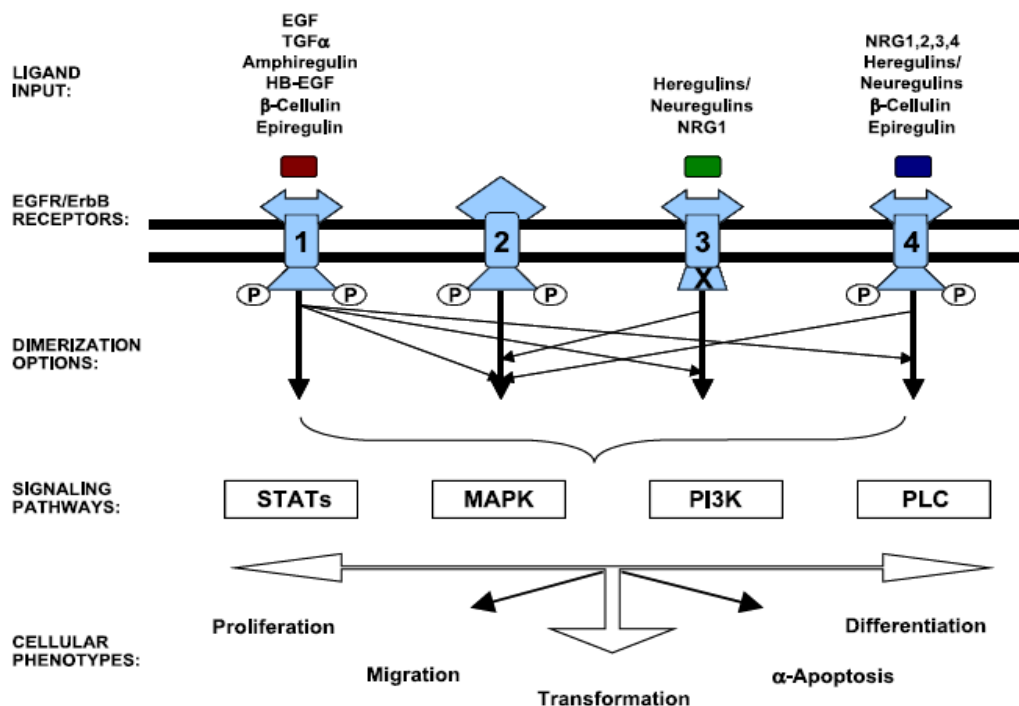


Figura n°2. En la superficie celular, al unirse el ligando con el receptor conduce a la fosforilación de la tirosina y varias opciones de dimerización del receptor (representadas por flechas: la flecha gruesa marca la homodimerización y la flecha delgada denota heterodimerización; el " X " en ErbB3 representa ausencia de la actividad intrínseca de tirosina quinasa). Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacology & Therapeutics* 102 (2004) 37– 46.

Respecto a la unión a receptores ErbB, los ligandos se pueden dividir en tres grupos (todavía no se ha identificado ningún ligando que se una al segundo miembro de la familia ErbB: ErbB2/Her2-neu) (Tabla nº 6)

Tabla nº 6. Los receptores ErbB y sus ligandos afines

Receptores ErbB	EGFR	ErbB-2	ErbB-3	ErbB-4
Ligandos afines	EGF	Ninguno	NRG 1	NRG 1
	TGF- α		NRG 2	NRG 2
	AR		NRG 3	NRG 3
	EPR		NRG 4	NRG 4
	BTC			Tomoregulin
	HB-EGF			HB-EGF
				BTC
				EPR

EGF (Epidermal Growth Factor), TGF- α (Transforming Growth Factor- α), AR (amphiregulin), EPR (epiregulin), BTC (betacellulin), HB-EGF (heparin -binding growth factor), neuregulin (NRG)

El EGFR interviene en la patogenia de los tumores sólidos debido a su desregulación por diferentes mecanismos, incluyendo la sobreexpresión del receptor, la activación de mutaciones, alteraciones en el proceso de dimerización, activación de bucles autocrinos de factores de crecimiento, endocitosis limitada o incrementada de receptores activados, deficiencia de fosfatasas específicas de desactivación de los residuos de tirosina de EGFR fosforilados y el recambio limitado (204).

La sobreexpresión del EGFR sin amplificación del gen, y la activación del EGFR por el TGF- α y por el EGF en un bucle autocrino, son dos de los principales mecanismos implicados en el desarrollo del cáncer y la progresión (205, 206).

A su vez la familia de los receptores ErbB pueden someterse a homo-o heterodimerización tanto constitutivamente y/o en respuesta a ligandos, lo que resulta en una enorme diversidad de señalización (207).

La activación del EGFR en las células cancerosas puede activar una cascada de señales, incluyendo: *ras/raf-1/mitogen-activated protein kinase (MAPK)*, *phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K/AKT)*, *phospholipase C α (PLC α)*, y señales transductoras y activadoras de transcripción (*STAT*) (Figura nº 3). En general, los cánceres epiteliales muestran la activación de STAT1, STAT3, STAT5 después de la estimulación del EGFR (208); esta cascada de señales produce la transcripción de genes responsables de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (209). A pesar de la multiplicidad de señalización de las vías del EGFR, varias líneas de evidencia apoyan una redundancia en la señalización del EGFR.

El método idóneo para la determinación de la expresión del EGFR no está claramente establecido, aunque las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y de radioinmunoanálisis han demostrado que su sobre-expresión en las células tumorales se correlaciona con una peor evolución clínica.

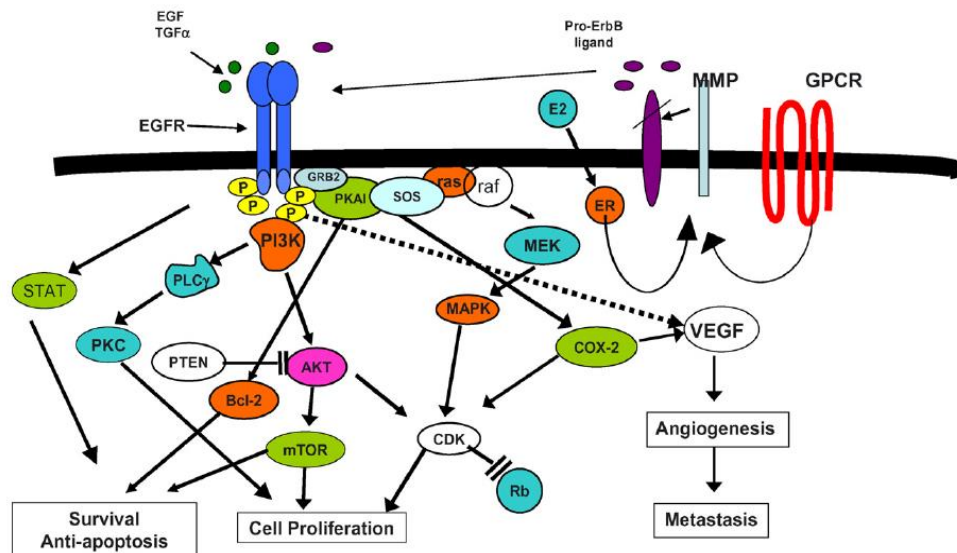


Figura nº3. Cascada de señalización de EGFR en las células cancerosas.

Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. IJBCB 39 (2007) 1416–1431

La expresión del EGFR en las células tumorales se ha asociado a pobres resultados clínicos después de la radioterapia, un ejemplo es la sólida relación observada en los tumores de cabeza y cuello (210-216). De igual forma, ha sido reportada una relación inversa entre la expresión del EGFR y la radiocurabilidad de los tumores, en los estudios pre-clínicos in vivo (217,218).

Existe evidencia de que la radiación ionizante tiene la capacidad de activar la señalización del EGFR y otros receptores de la tirosina quinasa, independientemente de la unión al ligando (219). Esta activación confiere una serie de respuestas cito protectoras, incluido el aumento de la proliferación celular y reducción de la apoptosis, predominantemente a través de la estimulación de las vías de PI3K/Akt y Ras/MAPK.

Por lo tanto, se cree que la activación del EGFR contrarresta el efecto citotóxico de la radiación, y posiblemente lleva al fenómeno conocido como "repoblación acelerada", en el cual la tasa de proliferación de las células tumorales incrementa durante el curso de la radioterapia. La radiación provoca la importación del EGFR del núcleo y aumenta los niveles de ADN-proteína quinasa dependiente (ADN-PK), que en última instancia mejora la reparación de los roturas de las cadenas de ADN y la supervivencia celular (220). Se ha demostrado que la radiación activa el EGFR y sus vías de señalización vía descendente en tumores radio-resistentes, pero no en los radio-sensibles (218).

Existe constancia de que la expresión del EGFR predice que pacientes se beneficiarán de la radioterapia acelerada, lo cual es particularmente relevante en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. Estudios previos examinaron diversos esquemas de fraccionamiento en los tumores de cabeza y cuello, y objetivaron que la prolongación del tiempo global de tratamiento se asocia a una reducida probabilidad de control loco-regional; esto condujo a la investigación de la eficacia de los esquemas de radioterapia acelerada en los carcinomas de cabeza y cuello. Los ensayos CHART, DAHANCA 6 y 7, y RTOG 9003 (214, 215,221) mostraron que la reducción del tiempo de tratamiento radioterápico mejoró el control loco-regional. Además, los ensayos CHART y

DAHANCA demostraron que los tumores con alta expresión de EGFR en particular, se beneficiaron de los regímenes acelerados.

En los tumores de cabeza y cuello, ovario, cérvix, vejiga y de esófago (222-227), es particularmente fuerte la asociación entre la sobre-expresión del EGFR y los pobres resultados en los pacientes, pues en diferentes estudios se ha observado una disminución del intervalo libre de enfermedad, estadios tumorales avanzados, incremento del riesgo de metástasis, y una menor supervivencia global, aunque también existen estudios que no hallan relación (228). En un análisis de 74 estudios de estos tipos de cáncer, realizado por Nicholson y col. (229), el 70% mostraron que el aumento de la expresión del EGFR se correlacionó con una reducción de la SLE y/o SG.

Así tenemos que en el estudio de 140 pacientes con carcinoma epidermoide de laringe, Maurizi y col. (222) encontraron que los niveles de EGFR (determinado por la técnica de receptor de radio-ligando) se correlacionaron con el riesgo de recaída y muerte, la SG a 5 años para los pacientes con tumores EGFR-negativo fue 81%, mientras que en los pacientes con tumores EGFR-positivo, la SG fue 25%; del mismo modo la SLE a 5 años fue 77% para los pacientes con tumores EGFR-negativo en comparación con el 24% para aquellos con tumores EGFR-positivo.

En el estudio de Hirai y col. (227), que incluyó 40 pacientes con cáncer esofágico, la SG a 5 años fue 69% para los pacientes con bajos niveles de EGFR y EGF, en contraste al 14% para los pacientes con altos niveles de EGFR y su ligando.

Varios autores han objetivado una relación entre la expresión del EGFR y el pronóstico en el cáncer gástrico, de mama, endometrio y colo-rectal (230-233); pero esta relación no es tan fuerte como en las primeras cinco localizaciones anteriormente mencionadas.

En el caso del cáncer gástrico, estudios han correlacionado la expresión del EGFR con enfermedad avanzada (234,235) y la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos (236,237). En algunos pequeños estudios (230, 235, 238), examinaron la expresión simultánea de EGFR y sus ligandos; y observaron que la co-expresión de EGFR y EGF o bien TGF- α se asoció a una marcada desventaja en la SG y/o SLE.

Nicholson y col. (239), objetivaron una fuerte asociación entre la expresión del EGFR y la pérdida de diferenciación en el cáncer de mama, también demostraron que niveles elevados del EGFR se correlaciona con enfermedad avanzada, mayor fracción de proliferación de las células tumorales e incapacidad de las pacientes para responder al tratamiento endocrino.

En el caso del cáncer colo-rectal, la expresión del EGFR se ha asociado con el grado y estadio tumoral (240,241), SLE (233) y SG (233, 242).

Es así que existen diferentes estudios sobre los niveles del EGFR y su capacidad de predecir la respuesta tumoral a la radioterapia, quimioterapia y/u hormonoterapia; incluso algunos tumores que expresan niveles elevados del EGFR tienen una resistencia aumentada a la terapia hormonal, como ocurre en el cáncer de mama (239,243).

Respecto a la quimioterapia, diversos ensayos han reportado que los tumores con sobre-expresión del EGFR pueden presentar una mejor respuesta a los citotóxicos como cisplatino o doxorrubicina (244), más aun cuando se ha añadido a la quimioterapia convencional un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (245, 246).

El uso de nuevos fármacos con un efecto inhibidor sobre la vía del EGFR, junto a quimioterápicos estándar y/o radioterapia dentro de ensayos clínicos en los últimos años, han despertado un enorme interés, pues algunos de ellos han empezado a considerarse como nuevas alternativas a la terapia convencional. Así pues el uso de inhibidores de la tirosina quinasa y anticuerpos anti-EGFR han mostrado efectividad en el tratamiento de algunas neoplasias (cabeza y cuello, pulmón, colo-recto) (245-247).

Sin embargo existe cierta incertidumbre en cuanto a cuando se deberían utilizarse estos fármacos, pues algunos postulan que sólo debería hacerse en los casos que se observe sobre-expresión del EGFR, empero existen diversos trabajos en los no hay una relación directa entre el grado de expresión del EGFR del tumor y la respuesta a estos fármacos (247-249).

4. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) EN EL CARCINOMA DE CUELLO UTERINO

La investigación científica está dando a lugar a un mejor entendimiento de las características moleculares del cáncer de cuello uterino, lo cual puede ayudar a mejorar los resultados y personalizar el tratamiento con las nuevas dianas terapéuticas. Muchos factores biológicos que ayudan a regular el control del ciclo celular, la apoptosis, la angiogénesis, o el potencial invasivo o metastásico han sido propuestos como determinantes pronósticos del cáncer de cuello uterino, ejemplos incluyen la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la densidad de los microvasos, mecanismos de hipoxia, y la expresión de la COX-2 entre otros.

El EGFR está presente en muchos tejidos normales y se expresa en una amplia variedad de tumores sólidos, incluido el carcinoma de cuello uterino.

Se ha observado que la expresión incrementada del EGFR se asocia a la infección por el HPV y con el aumento del grado de neoplasia intraepitelial (250); y como sabemos el HPV es considerado un factor etiológico en el desarrollo del cáncer cervical (251).

La oncoproteína E5 del HPV tipo 16 puede activar el EGFR, a través de su unión a una subunidad de la bomba de ATPasa, lo cual conduce a una reducción de la degradación, un aumento en el reciclaje y sobreexpresión del EGFR (252-254).

La expresión de la oncoproteína E6 del HPV de alto riesgo, se ha relacionado también con un aumento de los niveles del EGFR (255,256) y con cambios en su funcionalidad, los niveles de las proteínas E6/E7 del HPV pueden alterar la tasa de crecimiento de las líneas celulares del carcinoma de cérvix mediante una reducción de la estabilidad del EGFR a nivel post-transcripcional (257).

Debido a la inestabilidad genómica inducida por el HPV (258), se planteó la hipótesis de que el EGFR podría ser mutado. Sin embargo, existen estudios (259,260) que han demostrado que las mutaciones del EGFR son poco comunes en las lesiones cervicales de alto grado y en el cáncer invasor de cuello uterino, esto sugiere que las proteínas de HPV de alto riesgo afectan a la proteína EGFR, pero no a nivel genómico.

Los niveles de expresión del EGFR han sido reportados por una variedad de métodos, incluyendo estudios de unión de radioligandos, RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa), técnica de ELISA, citometría de flujo, FISH e inmunohistoquímica. Esta variedad de técnicas y la falta de estandarización, explicaría el encontrar una amplia gama de expresión del EGFR en el cáncer de cuello uterino desde 6% a 90%, y las discrepancias encontradas en relación al EGFR como un predictor de respuesta al tratamiento; pues mientras que varios estudios han hallado una relación entre la expresión del EGFR y el mal pronóstico, otros no han encontrado dicha asociación.

La expresión de EGFR mediante inmunohistoquímica:

La inmunohistoquímica (IHQ) es la técnica más comúnmente utilizada en la determinación de la expresión del EGFR. Es un método conveniente de bajo costo, que puede ser estandarizado contra controles conocidos y puede evaluar el nivel del EGFR activado, sin embargo existen muchas variaciones entre los protocolos publicados, la IHQ no es una técnica estrictamente cuantitativa y no existe un sistema de puntuación adoptado de manera uniforme, por lo tanto la interpretación de la tinción sigue dependiendo del observador.

A pesar de ello, existen 2 sistemas de puntuación que pueden ser usados, el sistema de Reiner (261) o de Remmele (262), utilizan la suma o el producto de la intensidad de tinción y el porcentaje de células teñidas, respectivamente.

Entre los estudios que encuentran relación entre la expresión del EGFR y un peor pronóstico tenemos (Tabla nº7):

Hale y col. (263), evaluaron la expresión del EGFR en 62 pacientes con carcinoma de cérvix, estadios FIGO IB-IIA (20 escamosos SCC, 21 adenocarcinomas ADC, 21 adenoescamosos ADS), tratadas con histerectomía radical más linfadenectomía pélvica. El 34% de los tumores presentaron sobre-expresión del EGFR, y fue más frecuente en los carcinomas epidermoides (SCC). Con un seguimiento de 5 años, sólo se halló una relación significativa entre la sobre-expresión del EGFR y la SG ($p=0.003$) en el subgrupo de histología adenoescamosa. Objetivaron una tendencia de mayor mortalidad en los SCC con sobre-expresión del EGFR, pero no alcanzó significación estadística. Respecto a éste estudio, la valoración de sobre-expresión del EGFR se basó en la intensidad de tinción y no en la distribución de células teñidas, como lo realizado por la mayoría de estudios; los autores no analizaron otras variables clínico-patológicas además de la histología y la afectación ganglionar. Sólo en los ADC objetivaron una relación entre la sobre-expresión del EGFR y la metástasis ganglionar. No realizaron un análisis multivariante para corroborar la independencia pronóstica del EGFR.

Kristensen y col. (264), en el análisis retrospectivo de 132 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix estadio FIGO IB tratadas con histerectomía radical más linfadenectomía pélvica (27 pacientes recibieron adyuvancia: 23 radioterapia externa pélvica con/sin quimioterapia, 4 sólo quimioterapia), observaron que según el análisis multivariante de la SLE, la sobre-expresión del EGFR o catepsina D obtuvieron valor pronóstico (EGFR $p=0.014$) y considerado en conjunto (uno de los dos positivos o ambos) (HR 11, IC95%: 2,3-51,7); fue el factor pronóstico más importante después del tamaño tumoral. En relación a éste estudio debemos destacar que el punto de corte tomado como sobre-expresión de EGFR fue bajo ($>10\%$ células). Aun así la muestra corresponde a un estadio tumoral precoz (estadio IB y sólo el 15% presentó un tamaño tumoral ≥ 4 cm). El performance status no se incluyó como variable a analizar, sólo el 19% de la muestra presentó metástasis ganglionar y aunque ésta logró significación en el análisis univariante, en el multivariante logró una tendencia ($p=0.06$).

Kersemakers y col. (265), determinaron la expresión del EGFR, c-erbB-2/neu, p53 y MDM-2 (proteína doble minuto murino-2) en 136 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO I y II (115 SCC, 9 ADS, 10 ADC) tratadas entre 1984 y 1995, mediante

histerectomía radical más linfadenectomía. Con una mediana de seguimiento de 48 meses, observaron una sobre-expresión del EGFR en el 54% de la muestra y se relacionó con un estadio FIGO avanzado, mayor tamaño tumoral, metastasis ganglionar e histología escamosa. En el análisis univariante, además del estadio FIGO, metastasis ganglionar y el tamaño tumoral, la sobre-expresión del EGFR se asoció a una disminución de la SG (54% vs 80%, $p=0,002$) y SLE (55% vs 88%, $p=0,003$). En el análisis multivariante de la SG, sólo permanecieron como factores pronósticos la metastasis ganglionar y la sobre-expresión de EGFR, mientras que en la SLE mantuvieron independencia pronóstica la metastasis ganglionar y el tamaño tumoral. Sobre éste estudio habría que destacar que para un subgrupo de pacientes con enfermedad localmente avanzada (IB2-II: 50) el tratamiento fue tan sólo quirúrgico; la mitad de la muestra presentó un tamaño tumoral $\geq 3\text{cm}$, la afectación ganglionar representó el 23% de la muestra, y no tomaron como variable clínica a analizar el performance status.

Cho y col. (266), determinaron la expresión de p63 (gen relacionado a p53) y EGFR en 84 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix estadio FIGO IIB tratadas con radio-quimioterapia concurrente, más braquiterapia HDR entre los años 1991 y 1996. Observaron que la sobre-expresión de EGFR se asoció con el fracaso extra pélvico ($p=0,03$), mientras que p63 fue asociado con el fracaso loco regional ($p=0,03$). La sobre-expresión de p63 y EGFR se asoció a una peor SG en el análisis univariante ($p=0,01$ y $p=0,04$, respectivamente), y en el multivariante p63 y EGFR no alcanzaron significación estadística, aunque se halló una tendencia ($p=0,05$, RR: 3,2 IC 95%: 2,0-4,4, y $p=0,07$, RR: 6,7 IC95%: 4,9-8,7, respectivamente). Sobre éste estudio habría que destacar que el punto de corte para determinar sobreexpresión del EGFR fue bajo ($>15\%$ células teñidas), no se consideró como variable clínica a analizar el performance status. La afectación ganglionar representó el 24% de la muestra (perdió significación en el análisis multivariante). El tratamiento administrado no fue el estándar actual (la quimioterapia se basó en CDDP y 5FU las semanas 1, 4, 7 de la radioterapia).

Gaffney y col. (267), estudiaron la sobreexpresión de VEGF, EGFR, COX-2, CD34, y Topoisomerasa II en 55 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO IB-IVA (48 SCC, 5 ADC, 2 ADS) tratadas con radioterapia externa más braquiterapia LDR (89%) entre los años 1981 y 1996. En el análisis multivariante además del estadio FIGO, la sobre-expresión del EGFR y VEGF se asociaron a una menor SG ($p=0,011$ y $p=0,005$, respectivamente). La expresión del EGFR fue mayor en los carcinomas SCC a comparación de los ADC. Respecto a éste estudio, los autores no describieron el punto de corte que tomaron para valorar la sobre-expresión del EGFR. A su vez no informaron sobre el número de pacientes con metástasis ganglionar; no tomaron en cuenta el tamaño tumoral o el performance status como variables clínicas a analizar. Asimismo debemos resaltar la ausencia de quimioterapia.

Kim GE y col. (268), evaluaron la sobre-expresión del EGFR y COX-2 en 68 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix estadio FIGO IIB tratadas con radio-quimioterapia concurrente más braquiterapia HDR entre los años 1992 y 1996. Con una mediana de seguimiento de 60 meses, no hallaron relación entre la sobre-expresión de EGFR y/o COX-2 y las variables clínicas analizadas. En el análisis univariante, la SG actuarial a 5 años fue mucho más baja en el grupo con sobre-expresión conjunta de EGFR/COX-2 ($p=0,009$, log-rank test). En cuanto a la SLE encontraron que la sobre-

expresión sincrona de EGFR/COX-2 alcanzó valor pronóstico en el análisis univariante y multivariante. En éste estudio, el punto de corte para la sobre-expresión del EGFR fue bajo ($>10\%$ células teñidas), el tratamiento quimioterápico no fue el estándar actual (bolus de $100\text{mg}/\text{m}^2$ de CDDP más 5-FU iv $1000\text{mg}/\text{m}^2$ las semanas 1,4,7 de la RT). Los autores no describieron si en el análisis multivariante de la SG, la sobre-expresión conjunta de COX-2/EGFR mantiene significación pronóstica. En el análisis univariante de la SLE la afectación ganglionar alcanzó valor pronóstico, sin embargo perdió valor en el análisis multivariante, llamando así la atención que sólo la expresión conjunta de EGFR/COX-2 permaneciera como único factor pronóstico. Por otro lado, en el análisis multivariante de la SLE, los autores no demostraron que la expresión de EGFR y COX-2 por separado, mantengan valor pronóstico, por otro lado el performance status no fue incluido como variable clínica a analizar.

Pérez-Regadera y col. (269), en la evaluación de 170 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO IB-IVA (150 SCC, 20 ADC, 20 ADS), tratadas con quimio-radioterapia más braquiterapia LDR entre los años 1994 y 2007, el análisis multivariante demostró que además de una edad ≤ 45 años, ECOG 2-3, metástasis ganglionar, estadio FIGO avanzado, ausencia de tratamiento con platino, la sobreexpresión aislada del EGFR o HER-2 (HR 2,54, IC 95% 1,25-5,14 $p=0,009$) adjudicaba una menor SLE, y que la co-expresión de EGFR/HER-2 fue un factor pronóstico independiente de pobre SLE (HR 2,9, IC95%: 1,26-6,66; $p=0,01$). De igual forma en el análisis multivariante de la supervivencia libre de fracaso pélvico (SLFP), objetivaron que la sobre-expresión aislada del EGFR o HER-2 alcanzó una tendencia ($p=0.05$), pero la sobreexpresión conjunta logró independencia pronóstica. Respecto a éste estudio debemos señalar que se utilizaron 2 esquemas de quimioterapia (antes de 1999 fue Tegafur $800\text{ mg}/\text{día}$ concurrente a RT [31% de la muestra] y a partir de Marzo de 1999 hacia adelante se utilizó CDDP $40\text{mg}/\text{m}^2$ semanal concurrente a RT). Además de la heterogeneidad respecto a la quimioterapia, sólo el 22% de la muestra presentó metástasis ganglionar.

Noordhuis y col. (270), en el estudio de 375 pacientes con cáncer de cérvix estadios IB-IVA (311 SCC, 52 ADC, 12 ADS) tratadas con radioterapia externa más braquiterapia LDR con/sin quimioterapia concurrente entre 1980 y 2006; y una mediana de seguimiento de 3.4 años, el análisis multivariante demostró que la sobreexpresión del EGFR y del EGFR fosforilado fueron predictores independientes de mala respuesta al tratamiento (HR1,84, IC95% 1,20-2,82, $p=0.005$ y HR1,17, IC95% 1,11-2,66 $p=0,016$, respectivamente). La sobreexpresión del EGFR fue más frecuente en los carcinomas escamosos ($p<0,001$) y en el análisis multivariante se asoció a una menor supervivencia enfermedad específica (DSS), al igual que la histología ADC y estadio FIGO avanzado. En relación a éste estudio debemos resaltar que el punto de corte tomado como sobre-expresión de EGFR fue bajo ($\geq 10\%$ células), el 50% del total de la muestra sólo recibió tratamiento radioterápico sin quimioterapia; administraron distintos esquemas de quimioterapia (antes de 1999 fue carboplatino en bolus de $300\text{ mg}/\text{m}^2$ el día 1, y 5-FU $600\text{mg}/\text{m}^2$ en infusión continua los días 2-5, c/28 días x 3 ciclos, después de 1999 fue CDDP $40\text{mg}/\text{m}^2$ semanal x 6 ciclos, concurrente a RT). Asimismo, no describieron la cantidad de pacientes con metástasis ganglionar, no tomaron a ésta como variable clínica a analizar, ni el performance status.

Por otro lado, existen también varios estudios que describen la ausencia de relación entre la sobreexpresión de EGFR y el pronóstico (Tabla nº8):

Hayashi y col. (271), estudiaron la relación entre metástasis ganglionar y la expresión de p21 y EGFR en 52 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix tratadas mediante cirugía, observaron que la expresión de EGFR en los tumores fue muy bajo (6%), y no hallaron una relación entre la expresión del EGFR y metástasis en los ganglios linfáticos. Respecto a éste estudio, resaltar que el anticuerpo Oncogene Science (Clone Y13-259) utilizado para detectar la expresión EGFR mediante IHQ resultó en una baja expresión similar a otros estudios (264), a diferencia a otros que objetivaron una mayor expresión mediante la técnica de ELISA (280).

Oka y col. (272), en la evaluación de la expresión del EGFR y catepsina D en 216 pacientes con carcinoma de cérvix estadio FIGO III (191 SCC y 25 ADC) tratadas con radioterapia externa y braquiterapia HDR en años previos a 1997, con un seguimiento global de 5 años, no encontraron una asociación significativa entre la expresión positiva de catepsina D o EGFR y el pronóstico (SG a 5 años, 58.7% en el grupo EGFR negativo vs. 54.1% EGFR positivo, $p=0.548$), sin embargo observaron que la expresión positiva de EGFR fue más alta en los tumores SCC que en los ADC (33% vs 16%, $p=0.088$). Sobre éste estudio debemos mencionar que el anticuerpo utilizado para valorar la expresión de EGFR fue muy distinto a aquellos utilizados por la mayoría de estudios, y aunque tomaron un punto de corte bajo para catalogar una sobre-expresión de EGFR ($\geq 5\%$ células), sólo se observó en el 33% y 16% de los SCC y ADC respectivamente. A su vez los autores no describieron el esquema de tratamiento radioterápico utilizado, y no analizaron variables clínicas como edad, tamaño tumoral, afectación ganglionar, o el performance status.

Chang y col. (273), en el estudio de 84 casos (12 tejido normal, 6 LSIL, 10 HSIL y 56 carcinomas escamosos invasivos tratados con cirugía), no encontraron relación entre los casos de carcinomas de cérvix con sobre-expresión de EGFR y metástasis ganglionar ($p<0.718$), sin embargo en éste mismo estudio sobre la expresión de los receptores ErbB1 (EGFR), ErbB2, ErbB3, ErbB4 hallaron una diferencia significativa entre el aumento del grado de displasia respecto a la expresión de estos cuatro receptores ($p<0.001$). Sobre éste estudio a pesar que tomaron un punto de corte bajo para catalogar la sobre-expresión de EGFR ($\geq 10\%$ células teñidas), éste no se relacionó a la metástasis ganglionar de un modo significativo, tal vez por el escaso número de pacientes con ésta afectación, 12 pacientes).

Ngan y col. (274), evaluaron la sobre-expresión del EGFR y/o cerb-2 en 101 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix estadios FIGO IB-IIIB, tratadas en años previos a 1999 con cirugía radical (n=16), cirugía y RT(n=13), RT \pm QT (n=72), con una mediana de seguimiento de 29 meses, no hallaron relación entre la sobre-expresión del EGFR y/o cerb-2 y la SG. Respecto a éste estudio además de observar una heterogeneidad en el estadio tumoral y en el tratamiento, los autores no describieron el esquema y dosis de la radioterapia administrada, tipo y esquema de quimioterapia, número de pacientes con metástasis ganglionar; y en el seguimiento se perdieron 24 pacientes. Las biopsias fueron almacenadas en nitrógeno líquido, aún así obtuvieron una alta sobre-expresión de

EGFR (74%), sin embargo éste no alcanzo valor pronóstico respecto a la SG, la única variable que obtuvo valor pronóstico fue el estadio tumoral.

Baltazar y col. (275), evaluaron la sobre-expresión de COX-2 y EGFR en 130 casos de carcinoma de cuello uterino (30 ADS, 50 ADC y 50 SCC) tratados entre los años 1986 y 2000. La expresión de COX-2 o EGFR fue significativamente diferente cuando se compararon los 3 tipos histológicos, la sobre-expresión del EGFR fue más frecuente en los SCC ($p=0.013$), sin embargo no objetivaron una diferencia significativa respecto a la histología cuando se evaluó la expresión conjunta de EGFR y COX-2. A su vez no encontraron relación entre las expresiones de COX-2 y/o EGFR y las variables clínicas analizadas. De igual modo no hallaron relación entre la SG y la sobre-expresión de EGFR y/o COX-2. Respecto a éste estudio debemos mencionar que quizá esta ausencia de relación se deba a un número de sesgos, como el origen del anticuerpo utilizado, la metodología usada en la dilución de los anticuerpos, las diferencias en los sistemas utilizados para evaluar la inmunohistoquímica positiva, aún así a pesar que el punto de corte para clasificar la expresión de EGFR fue muy bajo ($>5\%$ de células), sólo el 47% expresó EGFR. A su vez debemos señalar, que los autores no describieron el tratamiento administrado a las pacientes, el tiempo de seguimiento o el estadio FIGO.

Lindstrom y col. (276), evaluaron la expresión de 10 marcadores tumorales (entre ellos EGFR) y su significancia pronóstica en 128 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix estadios FIGO IB-IV tratadas con radioterapia y algunas con cirugía complementaria entre los años 1984 y 1990, después de estratificar a las pacientes por estadios IB-IIA vs IIB-IV y con un seguimiento global de 10 años, no hallaron relación pronóstica entre la sobre-expresión del EGFR y la SG ($p=0.81$), permaneciendo como único factor pronóstico el estadio FIGO. En cuanto a éste estudio debemos destacar que a pesar de haber tomado un punto de corte alto como sobre-expresión del EGFR ($\geq 50\%$ de células teñidas), hallaron una sobre-expresión en el 79% de la muestra, sin embargo a pesar de que las pacientes fueron tratadas sólo con radioterapia sin quimioterapia (sin descripción del tratamiento radioterápico), no hallaron relación pronóstica entre la expresión del EGFR y la SG. En un segundo estudio realizado por los mismos autores (277), en el cual añadieron pacientes con tumores ADC, observaron que el EGFR tuvo una mayor expresión en los tumores SCC respecto a los ADC.

Yamashita y col. (278), determinaron la expresión de 6 marcadores tumorales entre ellos EGFR en 57 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix estadios FIGO II-IVA, tratadas entre los años 1998 y 2005 con radio-quimioterapia concurrente y braquiterapia HDR. Con una mediana de seguimiento de 31 meses, en el análisis univariante no objetivaron valor pronóstico de la sobre-expresión del EGFR respecto a la SG, SLE, supervivencia libre de fracaso pélvico (SLFP) a 5 años ($p=0.82$, $p=0.76$, $p=0.99$, respectivamente), en el análisis multivariante sólo permanecieron con independencia pronóstica el estadio tumoral avanzado y la afectación ganglionar. Tampoco hallaron relación entre la sobre-expresión del EGFR y variables clínicas como la edad, estadio tumoral, metástasis ganglionar pélvica, para-aórtica y tamaño tumoral. Acerca de éste estudio, debemos describir que la valoración de sobre-expresión de EGFR se basó en un análisis cuantitativo (suma de la intensidad más el porcentaje de células teñidas) objetivándose un 50%. A pesar que la afectación ganglionar pélvica y para-aórtica no fue alta (16 y 23% respectivamente) estos alcanzaron valor pronóstico. Respecto al tratamiento, el esquema de quimioterapia administrado fue CDDP 75mg/m² en bolus los días 1, 22, 43 de la RT.

Eijsink y col. (279), evaluaron la expresión del EGFR entre otros marcadores en 336 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO IB-IIA tratadas entre los años 1980 y 2004 con histerectomía radical tipo 3 y disección ganglionar pélvica (aquellas con metástasis ganglionar, afectación parametrial o márgenes quirúrgicos positivos recibieron radioterapia adyuvante con/sin quimioterapia). Con una mediana de seguimiento de 5.5 años y una SG de 82%, observaron relación entre la sobre-expresión de EGFR y la histología escamosa ($p<0.01$), sin embargo en el análisis multivariante al evaluar la supervivencia enfermedad específica (DSS), sólo la pobre diferenciación histológica y la afectación ganglionar pélvica permanecieron como factores pronósticos. Debemos señalar que éste estudio halló metástasis ganglionar pélvica en el 28% de la muestra (la mayoría de estudios que encontraron valor pronóstico a EGFR, presentaron metástasis ganglionar alrededor del 20-23%).

La expresión de EGFR mediante la técnica de ELISA:

La técnica de ELISA se utiliza para detectar los niveles del EGFR en tejido o en suero. La ventaja de ésta, es que se requiere volúmenes más pequeños de tejido y la técnica es menos sensible a la degradación de la proteína EGFR que la IHQ. Sin embargo, este método mide el total de la proteína del receptor, por tanto no proporciona ninguna información sobre la localización celular, además que requiere una cuidadosa micro disección de las células cancerosas del estroma. El punto de corte para determinar la sobreexpresión del EGFR varía para las muestras de tumor o de suero, y hasta el momento no existe consenso sobre el punto de corte.

Respecto a la determinación de EGFR por el método de ELISA, existen 2 estudios representativos:

Kim YT y col. (280), determinaron el valor pronóstico de EGFR en el tejido tumoral de 73 pacientes con carcinoma de cérvix (64 SCC, 5ADC, 4ADS) tratadas entre los años 1993 y 1995 con conización o histerectomía radical modificada (estadio IA:7), histerectomía abdominal radical, linfadenectomía pélvica más muestreo ganglionar aórtico (estadios IB-IIA:27), o quimioterapia neoadyuvante basada en CDDP y posterior radioterapia pélvica estándar más braquiterapia (estadios IIB:7,III:29,IV:3). Con una mediana de seguimiento de 59 meses, el análisis multivariante reveló que la sobre-expresión de EGFR obtuvo valor pronóstico respecto a la SLE ($p=0,002$) y SG ($p=0,005$). Además hallaron una asociación entre los niveles altos de EGFR y mayor tamaño tumoral ($p=0.002$). Respecto a éste estudio además de observar la heterogeneidad de la muestra en cuanto a estadios, tratamiento e histología, la afectación ganglionar o el performance status no fueron incluidas como variables a analizar; destacar que en la actualidad sabemos que la quimioterapia neoadyuvante no logra resultados favorables y quizá esto ha causado sesgos.

Oh y col. (281), determinaron los niveles séricos del EGFR en el suero de 38 pacientes con carcinoma de cérvix (carcinoma invasivo o recurrente: 26 y carcinoma in situ [CIS]: 12) y en 38 controles sanos. La concentración sérica media del EGFR en las pacientes con carcinoma invasivo o recurrente (165 ± 60 fmol/ml) fue significativamente mayor en comparación con los controles sanos (66 ± 17 fmol/ml) ($p < 0,0001$) y también mayor respecto a los CIS (126 ± 25 fmol/ml) ($p=0.015$). Además, observaron una diferencia en

la media de los niveles séricos del EGFR entre los controles sanos y CIS ($p < 0.0001$). En resumen los niveles séricos del EGFR se elevaron en una proporción significativa en las pacientes con carcinoma de cérvix, y demostraron una tendencia creciente según la progresión de la enfermedad; desde un tejido normal, luego CIS y finalmente carcinoma invasivo de cérvix. En cuanto a éste estudio, a pesar de que los autores no evaluaron las tasas de supervivencia, resaltar el hecho que los niveles séricos de EGFR fueron incrementando conforme progresaba la enfermedad, esto de algún modo indicaría como EGFR está implicado en la evolución del cáncer.

La expresión de EGFR mediante la técnica de unión por radioligando

La técnica de unión por radioligando (I-125 EGF) es usada para determinar la localización de accesibilidad del receptor no ocupado en la superficie celular. Un obstáculo en el desarrollo de ésta técnica sería la cantidad de tejido estromal adherido a las células tumorales durante la extracción de las membranas celulares, lo que atenuaría la capacidad de unión debido al estroma que no contiene EGFR.

Pfeiffer y col. (282), estudiaron la capacidad de unión al EGFR en 52 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix estadios I-IV, tratadas con cirugía (sin especificar). Al ser comparadas con 40 biopsias de cuello uterino normal, la capacidad de unión al EGFR fue significativamente mayor en los carcinomas. Independientemente del estadio tumoral, las pacientes con un muy alto nivel de capacidad de unión al EGFR (>100 fmol/mg) fueron más propensas a tener recurrencias o a morir por la enfermedad. Respecto a éste estudio, además de ser una muestra pequeña, presentaron pocos eventos (5 recurrencias, 2 muertes), aun así los autores demostraron que la capacidad de unión es mucho mayor en los carcinomas comparado con tejido normal (55.16 ± 7.4 vs. 7.18 ± 1.09 fmol/mg, $p < 0.05$).

Scambia y col. (283), analizaron el valor pronóstico del EGFR en una serie prospectiva de 90 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO I-IV, tratadas anteriormente a 1998 (quimioterapia neoadyuvante a base de CDDP más histerectomía radical – tipo Piver III-IV, linfadenectomía pélvica y para-aórtica $n=72$; radioterapia exclusiva $n=18$). Los niveles del EGFR oscilaron desde 0 hasta 52,1 fmol/mg (mediana de 6,0 fmol/mg). Las pacientes con una fase avanzada de la enfermedad expresaron niveles del EGFR más bajos que aquellas con un estadio temprano (mediana: 7,8 fmol/mg para las pacientes con estadio I-II y 4,2 fmol/mg para las pacientes con estadio III-IV, $p=0,013$). No encontraron relación entre la expresión del EGFR y las variables clínicas estudiadas; no observaron una relación significativa entre la expresión del EGFR y la SG y/o la SLE. En el análisis univariante observaron que los niveles del EGFR no estaban se asoció al riesgo de recurrencia después del tratamiento; o al riesgo de muerte. Acerca de éste estudio, debemos destacar que el punto de corte tomado como capacidad de unión al EGFR fue la mediana de la muestra, por tanto la distribución de las pacientes fue uniforme, aun así solo el tamaño tumoral y el estadio FIGO alcanzaron valor pronóstico.

Tabla nº7. Relación entre la expresión del EGFR y el pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix.

Primer autor (referencia)	Método	Punto de corte	sobre-expresión	Nº pacientes	Histología	Estadio FIGO	Tratamiento	Seguimiento	Significado clínico
Hale (263) 1993	IHQ Ac. policlonal de conejo 12E	NM (intensidad de tinción)	34%	62	SCC 20 ADC 21 ADS 21	IB-IIA	HT radical + Linfx. pélvica	mínimo 60 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.003)
Kristensen 1996 (264)	IHQ Ac policlonal (Oncogene Science)	> 10% células	26%	132	SCC	IB	HT radical + Linfx. pélvica ± RHE ± QT adyuvante	mediana 74 meses	Análisis univariante ↓ SLE (p=0.07) Análisis multivariante ↓ SLE (p=0.014)
Kersemaekers 1999 (265)	IHQ Ac. monoclonal E30 (Biogenex San Ramon CA)	≥ 4-7 (intensidad + distribución)	54%	136	SCC 115 ADC 10 ADS 9	IA-IB1 80 IB2 22 II 28	HT radical + Linfx. pélvica	mediana 48 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.003) ↓ SLE(p=0.002) Análisis multivariante ↓ SG (p=0,04) SLE NS
Kim YT 2002 (280)	ELISA (Oncogene Science)	≥ 250 fmol/mg	71%	73	SCC 64 ADC 5 ADS 4	IA-IB 26 IIA 8 IIB 7 III 29 IV 3	IA: cono o HT radical IB-IIA: HT radical + Linfx. pélvica + Mt.pAo ≥ IIB: QT neoadyuvante (CDDP50mg/m ² + VC 1mg/m ²) +RHE 46Gy + BQT LDR	mediana 59 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.04) ↓ SLE(p=0.03) Análisis multivariante ↓ SG (p=0,005) ↓ SLE (p=0.002)
Cho (266) 2003	IHQ Ac. monoclonal (DAKO)	>15% células	26.6%	84	SCC	IIB	RHE 1ªFase 27-36Gy BQT HDR 30Gy (6Fx) RHE 2ªFase 45-50.4Gy + QT CDDP100mg/m ² 5FU1000mg/m ²	mínimo 60 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.04) Análisis multivariante ↓ SG (p=0.07) RR 6,7(95%IC 4,9-8)
Abreviaciones: IHQ(inmunohistoquímica),Ac.(anticuerpo),SCC(carcinomas de células escamosas), ADC(adenocarcinomas), ADS(adenoesquamosos), RHE(radioterapia de haz externo), BQT(braquiterapia), HDR(alta tasa de dosis), LDR(baja tasa de dosis), Fx (fracciones), QT (quimioterapia), HT (histerectomía), Linfx.(linfadenectomía),Mt(muestreo), pAo(para-aórtico), CDDP(cisplatino), VC(vincristina), 5FU(fluorouracilo), SG (supervivencia global), SLE (supervivencia libre de enfermedad), DSS(supervivencia enfermedad específica), NM (no mencionado), NS (no significativo), RR(riesgo relativo), IC (intervalos de confianza)									

Tabla nº7. Relación entre la expresión EGFR y el pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix (continua)

Primer autor (referencia)	Método	Punto de corte	sobre-expresión	Nº pacientes	Histología	Estadio FIGO	Tratamiento	Seguimiento	Significado clínico
Gaffney (267) 2003	IHQ Ac. monoclonal MO886 (DAKO)	NM (intensidad x distribución)	NM	55	SCC 48 ADC 5 ADS 2	IB-II 22 III 17 IV 4	RHE +BQT LDR (1-2Fx) mediana ptoA suma 80Gy (80-120 Gy)	mediana 24 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.037) Análisis multivariante ↓ SG (p=0.011)
Kim GE 2004 (268)	IHQ Ac monoclonal de ratón (DAKO)	>10% células	72%	68	SCC	IIB	1ºFase RHE 27-45Gy BQT HDR (6Fx) mediana pto A suma 84Gy 2ºFase RHE 45-50.4Gy	mediana 60 meses	Análisis univariante EGFR+COX2: ↓ SLE (p=0.001) Análisis multivariante EGFR+COX2: ↓SLE (p=0.03)
Pérez Regadera 2009 (269)	IHQ Ac monoclonal H11 M3363 (DAKO)	≥ 31% células	68%	170	SCC 150 ADC+ADS20	IB-IIA 21 IIB 47 IIIB 82 IVA 20	1ºFase RHE 46-50Gym 2ªFase BQT LDR 30Gy mediana pto A 26Gy + QT: Tegafur 800mg/día ó CDDP40mg/m²/semanal	NM	Análisis multivariante EGFR:↓ SLE (p=0.03) ↓ SLFP (p=0.04) Análisis multivariante EGFR: ↓ SLE (p=0.01) +HER2:↓ SLFP (p=0.007)
Noordhuis 2009 (270)	IHQ Ac. monoclonal 111.6 (Neomarkers)	≥10% células	35.3%	375	SCC 311 ADC 52 ADS 12	IB1 42 IB2 27 IIA 51 IIB179 IIIA 11 IIIB51 IVA 14	RHE ó RHE + QT: RHE 45Gy + BQT LDR (2Fx) +QT (CBP + 5FU/3ciclos ó CDDP/ semanal)	mediana 40 meses	Análisis univariante ↓DSS (p=0.015) ↓SG (p=0.016) Análisis multivariante ↓DSS (p=0.014) SG NS
Abreviaciones. IHQ (inmunohistoquímica), Ac. (anticuerpo), SCC(carcinomas de células escamosas), ADC(adenocarcinomas), ADS(adenoescamosos), RHE(radioterapia de haz externo), BQT (braquiterapia), HDR(alta tasa de dosis), LDR(baja tasa de dosis), Fx (fracciones), QT (quimioterapia), HT (histerectomía), HTRM(histerectomía radical modificada), Linfx (linfadenectomía), Mt.pAo (muestreo para-aórtico), CDDP(cisplatino), 5FU(fluorouracilo), CBP(carboplatino), SG (supervivencia global), SLE (supervivencia libre de enfermedad), SLFP(supervivencia libre de fracaso pélvico), NM (no mencionado), NS(no significativo).									

Tabla N°8. No relación entre la expresión EGFR y el pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix

Primer autor (referencia)	Método	Punto de corte	sobre-expresión	Nº pacientes	Histología	Estadio FIGO	Tratamiento	Seguimiento	Significado clínico
Oka (272) 1997	IHQ Ac monoclonal 12-93 (Kyokuto Japan)	≥ 5% células	33% SCC 16% ADC	216	SCC 191 ADC 25	IIIB	RHE +BQT HDR	global 5 años	Análisis univariante SG NS
Ngan (274) 2001	IHQ Ac monoclonal E3138 (Sigma Chemical Company)	>25% células	74%	101	SCC	IB-IIA 51 IIB 25 IIIA 4 IIIB 21	Cirugía radical (16) Cirugía + RHE (13) RHE±QT (72)	mediana 29 meses	Análisis univariante SG NS
Baltazar 2007 (275)	IHQ Ac policlonal clone 31G7 (Zymed Lab CA)	>5% células	47%	130	SCC 50 ADC 50 ADS 30	NM	NM	NM	Análisis univariante SG (p=0.53)
Linsdstrom 2007 (276)	IHQ Ac monoclonal E30 (DAKO)	≥50% células	79%	128	SCC	IB-IIA 68 IIB18 III 35 IV 7	RHE ± Cirugía adyuvante	global 10 años	Análisis univariante SG (p=0.81)
Yamashita 2009 (278)	IHQ Ac monoclonal 2-18C9 (DAKO)	≥5-7 (intensidad+ distribución)	52%	57	SCC	II 18 III 29 IV 10	RHE 50.4 Gy + BQT HDR (4fx/6Gy) + QT CDDP 75mg/m ² días 1,22,43 de RHE	mediana 30 meses	Análisis univariante SG (p=0.82) SLE(p=0.76) SLFP (p=0.99)
Eijsink(279) 2010	IHQ Ac monoclonal 111.6 (Neomarkers)	>10% células	32%	336	SCC 200 ADC 87 Otros 23	IB-IIA	HT radical + Linfx. pélvica ± RHE ± QT adyuvante	mediana 5.5 años	Análisis univariante DSS (p=0.46)
Scambia (283) 2010	RL	>6 fmol/mg	50%	90	SCC 83 ADC 7	I-II 45 III-IV 45	QT neoadyuvante + HT radical +Linfx pélv. y pAo/ ó RT exclusiva	mediana 41 meses	Análisis univariante SG (p=0.4)
Abreviaciones. IHQ (inmunohistoquímica), Ac. (anticuerpo), RL(radioligando), SCC(carcinomas de células escamosas), ADC(adenocarcinomas), ADS(adenoesquamosas), RTE(radioterapia de haz externo), BQT (braquiterapia), HDR(alta tasa de dosis), LDR(baja tasa de dosis), Fx (fracciones), QT (quimioterapia), HT (histerectomía), Linfx (linfadenectomía),pélvica(pélv.), pAo(para-aórtica), CDDP(cisplatino), SG (supervivencia global), SLE (supervivencia libre de enfermedad), DSS(supervivencia enfermedad específica), NM (no mencionado), NS (no significativo).									

La expresión de EGFR mediante reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR)

La RT-PCR se utiliza para detectar la amplificación del ADN del EGFR, la medición de ARNm de EGFR, mutaciones genéticas, o polimorfismos de genes, las muestras utilizadas para la detección pueden ser biopsias de tejido tumoral, células tumorales circulantes en sangre periférica (fracción mononuclear) e incluso citología cervical.

La amplificación del ADN del EGFR se produce entre el 12-35% de los casos de cáncer de cérvix, pero no se ha hallado una relación entre amplificación del ADN del EGFR y una sobreexpresión del mismo (265).

Los niveles de expresión de ARNm del EGFR medidos en sangre por RT-PCR, se han asociado a estadios avanzados de carcinoma de cérvix (284). Sin embargo, este método a menudo se asocia con problemas como la degradación del ARN y modulaciones post-transcripcionales, por tanto los niveles del EGFR basados en la medición de ARNm deben ser evaluados con cautela.

Respecto a las mutaciones del EGFR en el cancer de cérvix, 2 estudios han demostrado la ausencia de mutación del EGFR en el dominio tirosina-quinasa:

Arias Pulido y col. (259), investigaron la frecuencia de mutaciones puntuales del EGFR en 80 pacientes con carcinoma de cérvix invasivo y en 9 pacientes con lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL). No encontraron mutaciones que afectaran el dominio tirosina-quinasa de EGFR (exones 18-21) en todas las líneas celulares estudiadas.

De igual forma **Longatto-Filho y col.** (260), investigaron la sobre-expresión y mutación del EGFR mediante el uso de IHQ y PCR respectivamente, en un cohorte de 30 casos de carcinomas adenoescamosos de cérvix. A pesar de una expresión del EGFR en el 43% de la muestra, no identificaron mutaciones activadoras del EGFR en la región tirosina-quinasa.

5. USO DE INHIBIDORES DEL EGFR EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CÉRVIX.

Acerca de estudios que han utilizado un único agente como inhibidor del EGFR sin citotóxicos agregados, existe un ensayo prospectivo fase II con cetuximab como tratamiento de pacientes con carcinoma de cérvix persistente o recurrente, a cargo del GOG (285); el cual analizó la tolerancia a éste fármaco y su eficacia, los autores observaron una buena tolerancia a cetuximab, sin embargo no objetivaron una mejoría significativa respecto a la respuesta tumoral, ni en la SLP al menos de 6 meses (14.3%, visto sólo en los tumores de histología escamosa).

Respecto a ensayos clínicos con inhibidores de la tirosina quinasa como único agente, estudios de gefitinib (286), imatinib (287) y lapatinib (un doble inhibidor del EGFR y HER- 2) (288) no lograron buenos resultados; aun así cabe decir que esto era de esperarse, debido a la ausencia de mutaciones en el dominio de la tirosina- quinasa (las pequeñas moléculas inhibidoras de la tirosina quinasa como gefitinib, sólo actúan en aquellos tumores con mutación en el dominio tirosina quinasa).

En relación a estudios sobre combinaciones de un inhibidor de EGFR con la quimioterapia estándar; la combinación de cisplatino y cetuximab se estudió en un ensayo Fase II en enfermedad avanzada y persistente o recurrente de mujeres con cáncer de cérvix tratadas previamente (289). De una muestra de 69 pacientes (64% con quimio-radioterapia previa), la tasa de respuesta tumoral fue sólo 12% (9% en las pacientes con quimioterapia previa y 16% en aquellas sin quimioterapia), sin embargo el tratamiento fue bien tolerado. La expresión del EGFR fue analizada por IHQ en 48 pacientes, se observó que una mayor proporción de pacientes con enfermedad avanzada o recurrencia a corto plazo tuvieron una incrementada intensidad de tinción del EGFR respecto a aquellas con recurrencia a largo plazo.

Otro ensayo fase II en pacientes con carcinoma de cérvix avanzado tratadas previamente, no candidatas a rescate quirúrgico; fueron manejadas con una combinación de cisplatino, topotecan y cetuximab; éste ensayo fue terminado prematuramente debido a la excesiva toxicidad (neutropenia grado 3 y 4 en el 72%) y por la baja tasa de respuesta (32% alcanzó respuesta parcial) (290), los tratamientos previos y un pobre performance status podrían haber contribuido a la toxicidad observada, pero una interacción farmacocinética o farmacodinámica no pueden ser excluidos.

A razón de estudios sobre la combinación de radio-quimioterapia y un agente que bloquee la vía del EGFR, la combinación erlotinib, cisplatino y radioterapia (RHE más braquiterapia HDR) en el tratamiento de pacientes con CCLA (estadio FIGO IIB-IIB) de reciente diagnóstico, indujo una alta tasa de respuesta completa (91,3%) en un ensayo clínico fase II (291), la combinación fue factible y bien tolerada. La máxima dosis tolerada fue definida como 150 mg/día (292) en combinación con cisplatino semanal a dosis estándar concurrente a radioterapia. A pesar de los resultados alentadores de aquel ensayo (291), debemos resaltar que el estudio incluyó sólo 35 pacientes y sólo 23 fueron aptas para el análisis, y si bien en el momento del análisis ninguna paciente había progresado, la mediana de seguimiento fue corta (9 meses), éste estudio fue publicado en formato Abstract y presentado en el congreso anual de la

ASCO-2008, sin embargo hasta el momento no se han publicado resultados actualizados.

En el año 2012 se publicó un ensayo clínico Fase I a cargo del GOG (293), cuyo objetivo fue evaluar la seguridad de la combinación de cetuximab y la quimio-radioterapia (basada en CDDP) en pacientes recién diagnosticadas de CCLA. La dosis de cisplatino semanal 30 mg/m² y cetuximab 400 mg/m² de dosis carga, seguido de 250 mg/m² semanal fue la misma en ambos brazos (RHE pélvica vs. RHE extendida a para-aórticas –EFRT en aquellas pacientes con metástasis ganglionar), éste régimen fue factible sólo en el brazo de RHE pélvica, pues en el brazo EFRT las toxicidades fueron excesivas. Aún así cabe mencionar que la planificación de la RHE fue en 3D (no utilizaron IMRT), y la braquiterapia fue administrada al punto A.

Previo a éste último ensayo, se publicó otro en formato Abstract y fue presentado en el congreso anual de la ASCO-2012, un ensayo fase II de pacientes con carcinoma de cérvix (estadios FIGO IB-III) asignadas al azar a cisplatino y RT pélvica estándar con o sin cetuximab (294), los autores no encontraron diferencia entre los dos brazos en la habilidad para completar el tratamiento, o en las toxicidades grado 3, con excepción de la erupción asociada a cetuximab, sin embargo aún se encuentra pendiente la publicación de los resultados en cuanto a supervivencias y control local.

Existen más ensayos clínicos en curso que están evaluando el papel de cetuximab (u otro anticuerpo monoclonal que actué en la vía de EGFR) con/sin radio-quimioterapia en las pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix (Tabla n°9).

Tabla n°9. Ensayos clínicos en curso que evalúan MoAbs -EGFR como tratamiento en pacientes con cáncer de cuello uterino					
Nº Protocolo	Estadio clínico	Terapia blanco	Tratamiento estándar	Ensayo Fase	IP
NCT00292955	CCLA/ Metastásico	Cetuximab	Cisplatino+Radioterapia	Fase II	Linda R. Duska, MD
NCT00997009	Avanzado/ Recurrente	Cetuximab	Paclitaxel+carboplatino	Fase II	Sandro Pignata, MD
NCT00957411	Estadio IB-IIIB	Cetuximab	Cisplatino+Radioterapia + Braquiterapia	Fase II	Susan Scholl, MD
NCT01158248	Estadio IB-IIIB	Panitumumab	Cisplatino+Radioterapia + Braquiterapia	Fase II	Alain Zeimet
NCT01301612	Estadio IB-IVA (Adenocarcinomas)	Nimotuzumab	Cisplatino+Radioterapia + Braquiterapia	Fase II	Sergio Lago
MoAbs= Anticuerpo monoclonal, IP=Investigador principal, CCLA=Carcinoma de cérvix localmente avanzado.					

Los estudios preclínicos desarrollados en líneas celulares de cáncer de cuello uterino (295,296) confirman incluso en éste tumor, los resultados obtenidos por el grupo de Baselga (297): tanto la quimioterapia y radioterapia se unen a los efectos de cetuximab administrado conjuntamente; pero al parecer de una manera menos EGFR dependiente (es decir independiente de la expresión de EGFR) (296).

Sin embargo los resultados clínicos son menos alentadores, hasta la actualidad no se han registrado beneficios en la respuesta tumoral y/o supervivencia de las pacientes con cáncer de cuello uterino avanzado recurrente, metastásico, o enfermedad tratada previamente, al asociarse cetuximab (285, 289,290) o moléculas inhibidoras de la tirosina-quinasa (286-288).

6. EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) EN LOS TUMORES SÓLIDOS

Mediadores inflamatorios tales como citoquinas, eicosanoides y factores de crecimiento, desempeñan un papel crítico en la iniciación y mantenimiento de la supervivencia de las células cancerosas y su crecimiento (298).

Uno de estos mediadores, un eicosanoide: la prostaglandina E2 (PGE2) se forma a partir del ácido araquidónico y se produce en grandes cantidades por los tumores. El ácido araquidónico una vez liberado de la bicapa lipídica celular, puede ser metabolizado a través de tres vías: la vía de la ciclo-oxigenasa; la ruta de la lipoxigenasa, y la vía monooxigenasa o citocromo P-450.

Existen 2 isoenzimas ciclo-oxigenasas: COX-1 y COX-2. La COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos, mientras que la COX-2 es inducida en las células inflamatorias y en tumores humanos por citoquinas y promotores tumorales (299, 300). El gen que codifica COX-2 está localizado en el cromosoma 1, y su peso molecular es de 69 kDa. Estructuralmente la COX-1 y la COX-2 son parecidas, pero el sitio de unión para el ácido araquidónico es diferente, la COX-2 presenta un canal más amplio, que le permite el acceso a AINEs de gran tamaño que no penetrarían en el canal de la COX-1.

La mayoría de los tejidos, con excepción de la placenta, la mácula densa del riñón y el cerebro, no expresan constitutivamente COX-2 (301), sin embargo, una variedad de estímulos extracelulares e intracelulares inducirán rápidamente COX-2. Estos estímulos incluyen lipopolisacáridos, la interleuquina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), interferon γ , el factor activador de plaquetas (PAF) (302-307).

En 1994, Eberhart y Dubois (308) informaron que la COX-2, pero no la COX-1, se encontraba elevada en los cánceres colo-rectales, ellos encontraron que aproximadamente el 50 % de los adenomas y 80-85% de los adenocarcinomas tenían incrementada la expresión de la COX-2, por lo tanto esto exponía que la COX-2 podría estar involucrada en la carcinogénesis colorectal.

Los datos más concretos que apoyan una relación causa-efecto, entre la sobre-expresión de la COX-2 y la carcinogénesis provienen de estudios genéticos:

Oshima y col. (309), observaron que ratones heterocigotos para un alelo mutante de la poliposis adenomatosa colonica (APC Δ^{716}) desarrollaron cientos de pólipos intestinales, y cuando ratones desprovistos de COX-2 fueron cruzados con los ratones mutantes APC Δ^{716} , la carga tumoral en las crías disminuyó en una manera dosis dependiente génica. Este experimento proporcionó evidencia genética directa de que la COX-2 es importante para el desarrollo de los pólipos.

Luego Liu CH y col. (310), cruzaron ratones transgénicos con sobre-expresión el gen humano de la COX- 2 específicamente en las glándulas mamarias, y observaron que las

hembras multíparas presentaron una incidencia muy exagerada de hiperplasia focal glandular mamaria, displasia y transformación en tumores metastásicos. El tejido tumoral inducido por COX-2, expresó niveles reducidos de las proteínas proapoptóticas Bax y Bcl-x (L) y niveles elevados de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, sugiriendo que la disminución de la apoptosis en las células epiteliales mamarias contribuyó al desarrollo de la carcinogénesis.

Varios investigadores han demostrado que el tratamiento con dosis bajas de inhibidores selectivos y no selectivos de la COX-2 atenuan el crecimiento de las células cancerosas cultivadas como xenoinjertos en ratones (311-313).

Sheng y col. (312) demostraron que el tratamiento con un inhibidor altamente selectivo de COX-2 bloqueó el crecimiento de xenoinjertos HCA-7 (células cancerosas de colon humano que expresan COX-2) en ratones nude.

En un segundo estudio (314) los autores evaluaron el papel de la COX-2 y sus derivados, sobre la apoptosis en células cancerosas de colon humano; objetivaron que el tratamiento con PGE2 condujo a un aumento de la clonogenicidad de HCA-7, pero no en las células HCT-116 (carentes de la expresión de COX-2); el tratamiento con un inhibidor altamente selectivo de COX-2 (SC-58125) disminuyó la formación de colonias en cultivo, y aquella inhibición del crecimiento fue revertida por el tratamiento con PGE2. La PGE2 inhibió la apoptosis causada por SC-58125 y aumento 4-5 veces los niveles de Bcl-2, además de inducir la vía de la *MAPK*; por lo tanto estos resultados podrían ayudar a explicar una parte del mecanismo por el cual los inhibidores de la COX-2 previenen el cáncer colorectal en los seres humanos.

Asimismo Xin-Hua Liu y col. (315), evaluaron el papel potencial de la COX-2 en el cáncer de próstata; líneas celulares cancerosas de próstata humana (LNCaP) que expresaban COX-2 fueron tratadas con NS398, un inhibidor selectivo de COX-2. El tratamiento con NS398 indujo la apoptosis en las LNCaP de una manera dependiente del tiempo y de la dosis. El tratamiento con 100µM NS398 originó un descenso en la expresión de la proteína Bcl-2, seguido de una condensación de la cromatina, fragmentación del ADN cromosómico y cambios en la morfología nuclear. En contraste, el tratamiento NS398 no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular, la función o morfología nuclear en los fibroblastos fetales de próstata humana. Estos resultados demostraron que NS398 induce la apoptosis en las LNCaP, pero no en fibroblastos fetales de próstata humana; y que esta inducción se asocia a la disminución del nivel de proteína Bcl-2.

Es así que se han observado cantidades elevadas de la COX-2 en tejidos premalignos y tumores malignos (316), y esto se debe a que la COX-2 afecta a muchos procesos que son importantes en la carcinogénesis, incluyendo el metabolismo de xenobióticos, angiogenesis, apoptosis, inflamación e inmunosupresión y la invasividad (Figura nº 4).

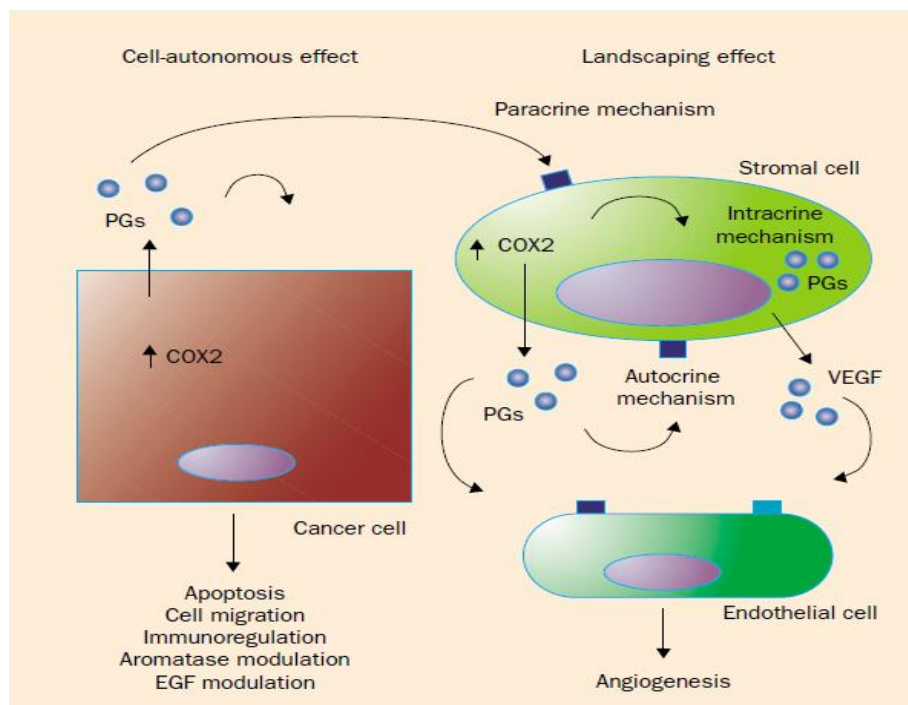


Figura nº 4. La COX-2 está sobre-expresada en diferentes tipos celulares como en los macrófagos, sinoviocitos, fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales tumorales y en las células endoteliales activadas, y pueden contribuir al crecimiento tumoral a través de diferentes mecanismos: las prostaglandinas COX-2 dependientes pueden estimular receptores intracelulares (mecanismo intracrino), pueden estimular a sus propios receptores de membrana (mecanismo autocrino), y estimular a receptores de membrana de diferentes células, tales como células endoteliales, con efectos proangiogénicos (paracrino o a distancia).

Metabolismo de xenobióticos:

La COX es una enzima bi-funcional, tiene actividad ciclo-oxigenasa y peroxidasa. La actividad ciclo-oxigenasa de COX oxida el ácido araquidónico a PGG₂ y su actividad peroxidasa convierte PGG₂ en PGH₂. En el hígado, estas reacciones oxidativas son principalmente catalizadas por el citocromo P450, sin embargo muchos tejidos fuera del hígado, tales como el colon tienen bajas concentraciones de citocromo P450 y de otras mono-oxigenasas, en estos casos cantidades sustanciales de xenobióticos pueden ser co-oxidados a mutágenos por la actividad peroxidasa de COX, esta actividad probablemente es relevante en órganos con bajas concentraciones de citocromo P450 como son el pulmón, cavidad oral y vejiga.

De igual forma la metabolización del ácido araquidónico por COX-2 puede producir mutágenos, pues productos resultantes de la oxidación del ácido araquidónico (tales como el malondialdehído) son altamente reactivos y alteran el DNA, y además existe evidencia que las PGs derivadas de COX-2 pueden ser metabolizadas por selectivos citocromos P450 a malondialdehído (317), por tanto esta vía podría contribuir al desarrollo del cáncer. Por otro lado, la COX-2 puede ser inducida por procarcinógenos, como por ejemplo el benzopireno (un hidrocarburo aromático policíclico presente en el humo del tabaco y comidas ahumadas), éste puede estimular la transcripción de COX-2 (318). Más tarde la COX-2 cataliza la conversión de benzopireno 7,8 -diol a benzopireno 7,8-diol-9,10 epóxido (un potente carcinógeno) el cual se liga al DNA (319).

Angiogénesis

Varios estudios han demostrado una relación entre la angiogénesis y la expresión de COX-2, se ha observado que la expresión de COX-2 induce factores proangiogénicos tales como VEGF, óxido nítrico sintasa inducible, interleuquinas 6 y 8, y TIE (receptor de angiopoyetinas 1-2) (320, 321), y además produce prostaglandinas que tienen efectos autocrinos y paracrinos sobre la proliferación y la migración de las células endoteliales *in vitro*. Así también las prostaglandinas derivadas de COX-2 estimulan la angiogenesis *in vivo*, y la inhibición de COX-2 en las células endoteliales enlentece el crecimiento tumoral, independientemente de la expresión de COX-2 (320).

Mediante dos modelos *in vitro* de co-cultivos de células endoteliales y de células de carcinoma de colon, Tsujii y col. demostraron que la COX-2 modula la producción de factores angiogénicos en las células tumorales, mientras que COX-1 regula la angiogénesis de células endoteliales en tejidos normales (321).

Una significativa asociación de COX2 con la vascularización tumoral, la densidad de los microvasos, y VEGF se ha reportado en los tumores de cabeza y cuello (322), así como la relación entre la densidad de los microvasos y la expresión de COX-2 en los adenocarcinomas gástricos (323).

Apoptosis

El tamaño de la población celular depende del balance entre la proliferación y la muerte celular. Un descenso de la apoptosis ha sido observado en lesiones pre-malignas y neoplasias malignas. Células epiteliales intestinales de ratas manipuladas genéticamente para sobre-expresar COX-2, tuvieron cantidades incrementadas de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) y fueron resistentes a la apoptosis estimulada por butirato (324), el tratamiento con sulindac revertió la resistencia a la apoptosis conferida por la sobre-expresión de COX-2.

El aumento de la concentración de ácido araquidónico que no se convierte en eicosanoides, al usar AINEs o coxibs estimula la enzima esfingomielinasa que convierte la esfingomielina en ceramida, un potente inductor de apoptosis. El ácido araquidónico esterificado modula la permeabilidad mitocondrial, pues causa la liberación de citocromo C, dando lugar a la apoptosis (325).

Se han descrito mecanismos pro-apoptosis COX-independientes (como la inhibición del factor proliferativo NFκB o de la proteína promotora del crecimiento PPARδ) producidos por los Coxibs (326), por tanto parece que los AINEs ejercen su efecto quimiopreventivo por mecanismos tanto COX-dependiente como COX-independiente.

Grosch y col. (327) demostraron que el bloqueo del ciclo celular en G0/G1 causado por celecoxib en líneas celulares de cáncer de colon y en modelos *in vivo*, se relaciona con la disminución de la expresión de las ciclinas A y B1, y a la expresión de las proteínas inhibidoras del ciclo celular p21WAF1 y p27KIP1.

Inflamación e inmunosupresión

La inflamación crónica es un reconocido factor de riesgo para la carcinogénesis epitelial (328). La inflamación *per se* esta asociada con el aumento de las síntesis de prostaglandinas, en parte a través de la inducción de citoquinas - mediadas por COX-2.

El crecimiento de los tumores típicamente esta asociado con la inmunosupresión (329), factores estimulantes de colonias liberados por las células tumorales, activan a los monocitos y macrófagos para sintetizar prostaglandina E2 (PGE2), la cual inhibe la producción de linfoquinas immuno-reguladoras, la proliferación de células T y B, y la actividad citotóxica de las *natural killer cells*. La PGE2 también inhibe la producción del TNF, mientras induce la producción de IL-10, la cual tiene efecto inmunosupresor (330). Se cree que los inhibidores selectivos de la COX-2 promueven una actividad antitumoral al restablecer el balance entre IL-10 e IL-12, lo cual se ha observado en estudios *in vivo* (331).

Invasividad de las células tumorales

La COX-2 activa la Metaloproteinasa 1 y 2 (MMP1 y MMP2) (332), y se asocia con el aumento de expresión de CD44 (receptor de la superficie celular de hialuronato) que promueve invasión de las células tumorales (333).

En líneas celulares de cáncer de colon, la expresión de COX-2 y el tratamiento con PGE2 indujo la expresión de glucosiltransferasas y de antígenos sialil-Lewis tipo I dando lugar a una mayor adhesión de células tumorales a células endoteliales, favoreciendo así metástasis hepática, el celecoxib suprimió estos cambios fenotípicos (334). En un modelo con ratones, rofecoxib redujo el tamaño de los tumores colorectales primarios y el grado de metástasis hepáticas, solo o en combinación con agentes citotóxicos, éste efecto se asoció con una menor concentración tumoral de catenina, ciclina D1, VEGF, MMP2, MMP9, e IL- 10, pero cantidades más altas de IL-12 (inhibidora natural de la angiogenesis) (335).

Dormond y col. (336) mostraron que PGE2 y PGI2 están involucradas en la activación de las pequeñas GTPasas (CDC42 y RAC), las cuales activan a la integrina $\alpha\beta3$. Los AINEs suprimen la activación de la integrina $\alpha\beta3$ dependiente de las pequeñas GTPasas, e inhiben la propagación de células endoteliales y la migración *in vitro*, así como la angiogenesis inducida por PGF2 *in vivo*. La COX-2 puede contribuir al crecimiento de las células metastásicas por mecanismos autocrino, paracrino o intracrino, o una combinación de ellos (Figura nº4). Se ha observado que la COX-2 puede estar sobre-expresada en la neovascularización ósea (337).

Es así que existen estudios que muestran una relación entre la expresión de COX-2 en diferentes tumores: mama, estómago, esófago, colo-recto, cabeza y cuello, pulmón no microcítico, próstata, vejiga, ovario, cérvix (338-357); y una disminución en las supervivencias, así como una relación con factores clínico-patológicos (estadio tumoral avanzado, incremento del riesgo de metástasis en los ganglios linfáticos y a distancia), pero también existen publicaciones que no encuentran relación con un mal pronóstico (358-366).

7. EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) EN EL CARCINOMA DE CUELLO UTERINO

Como anteriormente hemos descrito, la inflamación contribuye a la carcinogénesis (incluido el cáncer de cuello uterino), así como al desarrollo de recurrencias de lesiones pre-invasivas e invasivas (367,368) es por ello que las mujeres fumadoras, inmunocomprometidas, o que presentan una inflamación crónica, tienen un mayor riesgo de cáncer de cérvix en el contexto del HPV (367, 369,370), éstas observaciones han llevado a investigar el sistema inmune y los posibles inmunomoduladores en el desarrollo del carcinoma de cérvix.

Además de los efectos directos sobre el ADN epitelial, la infección crónica por HPV en el epitelio cervical conduce a un aumento del recambio celular y de los mediadores de la inflamación, creando así un medio ambiente favorable para la carcinogénesis (371).

Dannenber y col. (372) objetivaron la implicación de la vía de señalización del EGFR en el aumento de la COX-2 en líneas celulares cancerosas. En adición, Subbaramaiah y col. (373), demostraron que la transcripción de COX-2 está regulada por las oncoproteínas E6 y E7 del HPV16 a través de la señalización del EGFR, estos datos proporcionan un enlace entre la sobre-expresión de COX-2 y el carcinoma de cérvix a través del HPV.

El factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) también están sobre-regulados en el contexto del cáncer de cuello uterino (374,375). El NF- κ B es un factor de transcripción que una vez activado en el contexto de daño celular, da lugar a una rápida sobre-regulación en la expresión de genes de enzimas pro-inflamatorias. Esta activación crea un bucle de retroalimentación positiva para aumentar TNF- α e inducir la producción de COX-2 en las células epiteliales.

Así como diversos estudios han encontrado que la COX-2 se sobreexpresa en varios tumores sólidos humanos y se ha relacionado con un pronóstico desfavorable, también algunos han demostrado que la expresión de COX-2 esta incrementada en los grados más severos de displasia cervical y en el cáncer invasor de cérvix en comparación con tejido cervical inflamado y normal (376-378). A su vez la expresión de la COX-2 se ha relacionado con recurrencia en ganglios para-aórticos en pacientes tratadas con radioterapia exclusiva (379), de igual manera Ferrandina y col. (380) hallaron un pronóstico desfavorable en aquellas pacientes con un alto valor de densidad integrada (método de cuantificación para la expresión de COX-2) respecto a aquellas con un bajo valor.

La gran mayoría de estudios realizados sobre los niveles de expresión de COX-2 han utilizado como método de detección la inmunohistoquímica (IHQ), aun así la falta de estandarización sobre el punto de corte a tomar para clasificar una sobre-expresión, las diferencias encontradas según la histología, explicaría tal vez la gran variabilidad de expresión de COX-2 en el cáncer de cuello uterino (24% a 76%), así como las discrepancias encontradas en relación a COX-2 como factor pronóstico.

Entre los estudios que encuentran relación entre la expresión de COX-2 y el pronóstico tenemos (Tabla nº10):

Ferrandina y col (380), investigaron la expresión de COX-2 mediante IHQ; y su valor pronóstico en 84 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO IB-IVA, tratadas entre los años 1995 y 2000, en los casos de estadio precoz (\leq IIA y <4 cm) realizaron histerectomía radical y en los tumores localmente avanzados (63 casos) se realizó quimioterapia neoadyuvante (CDDP 100 mg/m², cada 3 semanas, 2-3 ciclos), en el caso de objetivarse respuesta se sometieron a histerectomía radical más linfadenectomía, de lo contrario se realizó radioterapia exclusiva. Los autores observaron que la sobreexpresión de COX-2 se asoció a una menor susceptibilidad del tumor al tratamiento neoadyuvante. Objetivaron que la sobre-expresión de COX-2 se relacionó a estadios FIGO más avanzados, a la histología (adenocarcinomas), tumores bulky y a la afectación parametrial. En el análisis univariante la SG a 2 años fue 38% en las pacientes COX-2 positivas vs. 85% de aquellas con COX-2 negativo, también el estadio FIGO y clasificación histológica alcanzaron significación estadística, sin embargo en el análisis multivariante sólo el estadio FIGO avanzado y la positividad de COX-2 mantuvieron un valor pronóstico. Objetivaron una tendencia de peor pronóstico de la SLE en aquellas pacientes COX-2 positivo, aunque no alcanzó significación estadística. En relación a éste estudio podemos resaltar que el tratamiento administrado no fue el que más adecuado, debido a que en la fecha de reclutamiento de las pacientes, aún no se había dado la alerta sobre la radio-quimioterapia concurrente como un tratamiento más eficaz que la neoadyuvancia o a la cirugía en los tumores localmente avanzados.

Kim YB y col. (381), investigaron la expresión de COX-2 mediante IHQ, como factor pronóstico en 75 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix, estadio FIGO IIB tratadas con radio-quimioterapia concurrente entre los años 1991 y 1996. Con una mediana de seguimiento de 60 meses, observaron que la sobre-expresión de COX-2 no se relacionó con ningún parámetro clínico-patológico. Sin embargo la SG actuarial a 5 años fue 56% en las pacientes COX-2 positivo y 94 % en las pacientes COX-2 negativo ($p=0,0003$; log -rank test), la SLE actuarial a 5 años fue 47% para las pacientes COX-2 positivo y 81% en las pacientes COX-2 negativo, ($p=0,003$; log -rank test). En el análisis univariante de la SG y SLE actuarial a 5 años, la afectación de parametrios y la sobre-expresión de COX-2 alcanzaron valor pronóstico, sin embargo en el análisis multivariante la sobre-expresión de COX-2 se mantuvo como único factor pronóstico. Sobre éste estudio, destaca que sólo la afectación parametrial además de la sobre-expresión de COX-2 obtuvieron valor pronóstico en el análisis univariante (la afectación ganglionar en 13 pacientes, no obtuvo significación estadística), y sólo COX-2 mantuvo su valor pronóstico en el análisis multivariante. Resaltar que el performance status no fue incluida como variable clínica a analizar, además sobre el tratamiento habría que resaltar que la quimioterapia administrada no fue la estándar actual (3 ciclos de CDDP en bolus de 100mg/m² y 5-FU en infusión continua a dosis de 1000 mg/m²/día por 5 días, las semanas 1, 4, 7 de la radioterapia).

Gaffney y col. (382), evaluaron la expresión mediante IHQ de VEGF, EGFR, COX-2, CD34, y Topoisomerasa II en 55 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO IB-IVA (48 escamosos SCC, 5 adenocarcinomas ADC, 2 adenoescamosos ADS) tratadas con radioterapia externa más braquiterapia (89%) entre los años 1981 y 1996. En el análisis multivariante la sobre-expresión de COX-2 y VEGF se asociaron a una menor SLE ($p=0,012$ y $p=0,014$, respectivamente) además del estadio FIGO. Además objetivaron una relación significativa entre COX-2 y Topoisomerasa II ($p=0,04$).

Respecto a éste estudio, es confuso que en el análisis univariante de la SLE, VEGF y COX-2 no alcanzaron valor pronóstico, pero si en el análisis multivariante. Por otro lado, los autores no describieron el número de pacientes con metastasis ganglionar, tampoco se tomó en cuenta el tamaño tumoral o el performance status como variables clínicas a analizar.

Kim, YB y col. (383), en un segundo estudio investigaron el significado pronóstico de la expresión de COX-2 según el tipo histológico (mediante IHQ) en 105 pacientes con carcinoma de cérvix estadio FIGO IIB, tratadas entre 1990 y 1996 con radio-quimioterapia concurrente. Observaron que la expresión de COX-2 fue más frecuente en los ADC que en los SCC (57% vs 24%, $p=0.007$), además todas las pacientes COX-2 negativo alcanzaron respuesta clínica completa después del tratamiento inicial, independientemente del tipo histológico. La incidencia de fracaso local en las pacientes con sobre-expresión de COX-2 fue significativamente mayor, independientemente del tipo histológico. Con un seguimiento mínimo de 60 meses, la SG actuarial a 5 años fue más baja en las pacientes COX-2 positivas ($p=0,001$). Las pacientes con ADC/COX-2-positivo presentaron peor pronóstico. Al realizar el análisis univariante encontraron que el tipo histológico, la afectación ganglionar y la expresión de COX-2 alcanzaron significación estadística, sin embargo al realizar el análisis multivariante sólo la sobre-expresión de COX-2 permaneció como único factor pronóstico independiente. En éste estudio habría que destacar que sólo 16 pacientes (15%) presentaron afectación ganglionar, además al realizar el análisis univariante y multivariante no se consideró el performance status como una variable a investigar. Los autores describen que en el análisis multivariante respecto al fracaso local, la sobre-expresión de COX-2 permaneció como único factor pronóstico, pero no mencionan que variables clínico-patológicas se consideraron en dicho análisis. De otro lado, la quimioterapia en las pacientes con ADC se basó en el uso de 3 fármacos (CDDP, ciclofosfamida y doxorubicina) lo cual podría haber sido muy tóxico y por tanto las pacientes podrían no haberse adherido completamente al tratamiento y esto traducirse en una disminución en las tasas de supervivencia, en cuanto al tratamiento de las pacientes con tumores escamosos la quimioterapia no fue la estándar actual.

Kim GE y col. (268), evaluaron el potencial pronóstico de la sobre-expresión conjunta de EGFR y COX-2 (mediante IHQ) en 68 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix estadio FIGO IIB tratadas con radio-quimioterapia concurrente entre los años 1992 y 1996. Con una mediana de seguimiento de 60 meses, no hallaron relación entre la expresión de EGFR y/o COX-2 con ninguna de las variables clínico-patológicas. Sin embargo observaron que las pacientes con EGFR positivo/COX-2 positivo presentaron una mayor probabilidad de recurrencia locoregional respecto a los otros tres grupos ($p=0,02$). En el análisis univariante la SG actuarial a 5 años fue mucho más baja en el grupo EGFR positivo/COX-2 positivo comparados con los otros 3 grupos ($p=0.009$, log-rank test). En cuanto a la SLE actuarial a 5 años se encontró que la coexpresión sincrónica de EGFR y COX-2 alcanzó valor pronóstico tanto en el análisis univariante como en el multivariante. Sobre éste estudio, debemos señalar que a pesar del bajo porcentaje de sobre-expresión de COX-2 en la muestra (28%), aun así obtuvo valor pronóstico. Sin embargo los autores no realizaron el análisis multivariante de la SG, para confirmar si la sobre-expresión conjunta de COX-2/EGFR mantiene valor pronóstico de forma independiente. En el análisis univariante de la SLE además de la sobre-expresión conjunta y por separado de EGFR/COX-2, la afectación ganglionar también alcanzó

valor pronóstico, sin embargo ésta perdió su significación en el análisis multivariante, donde sólo la expresión conjunta de EGFR/COX-2 permaneció como único factor pronóstico independiente.

Chen HH y col. (384), investigaron la expresión (mediante IHQ) de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y de COX-2, y la significación pronóstica en 167 pacientes con carcinoma de epidermoide de cérvix estadios FIGO IB-IVA tratadas con radioterapia externa y braquiterapia entre 1989 y 2002 (sólo 26 pacientes recibieron quimioterapia). No hallaron relación entre la expresión de COX-2 y las variables clínico-patológicas, pero sí encontraron relación entre la expresión de COX-2 e iNOS. Con una mediana de seguimiento de 4,6 años; en el análisis univariante para la SG a 5 años; la edad, el tamaño tumoral, estadio FIGO, la expresión positiva de iNOS y COX-2 alcanzaron significación pronóstica, más aún las pacientes que presentaron una sobre-expresión conjunta de ambas oncoproteínas presentaron peor SG. En cuanto a la SLE, en el análisis univariante la expresión positiva de iNOS y COX-2, así como el tamaño tumoral, estadio FIGO alcanzaron significación pronóstica, lo cual se mantuvo en el análisis multivariante. La sobre-expresión de ambas iNOS y COX-2, respecto al patrón de fracaso metastásico alcanzaron significación estadística tanto en el análisis univariante como el multivariante. Respecto a éste estudio cabe señalar que la gran mayoría de pacientes sólo recibió tratamiento radioterápico sin quimioterapia, esto de algún modo influiría en las tasas de supervivencia, además no se tuvo en cuenta la afectación ganglionar y el performance status como variables a investigar; en cuanto a la SG los autores no mencionan un análisis multivariante. Atrae la atención que en el análisis del fracaso metastásico variables como el tamaño tumoral, estadio FIGO pierdan su significación, permaneciendo sólo la expresión de iNOS y COX-2.

Pyo H y col. (385), evaluaron la importancia pronóstica de la expresión de la timidina fosforilasa (TP) y de COX-2 mediante IHQ en 75 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix estadio FIGO IIB tratadas con radio-quimioterapia. No hallaron relación entre la sobre-expresión de COX-2 o TP con ninguna variable clínico-patológica. En el análisis univariante de la SG, encontraron que la expresión conjunta obtuvo una peor supervivencia, de igual forma en la SLE, en el análisis multivariante describen que tanto la sobre-expresión aislada como conjunta de COX-2 y TP obtuvieron significación pronóstica. En éste estudio destaca que las clásicas variables clínico-patológicas como la afectación parametrial, afectación ganglionar y tamaño tumoral no alcanzaron significación pronóstica en el análisis univariante o en el multivariante respecto a la SG y SLE. En el análisis univariante de la SG, los autores no describen si COX-2 o TP alcanzaron significación por separado, a su vez debemos señalar que no se incluyó el performance status como variable clínica a estudiar y que la afectación ganglionar fue mínima (sólo 13 pacientes, 17%), por otro lado la quimioterapia fue entregada cada 21 días (CDDP 100 mg/m² y 5FU 1000 mg/m²).

Khunamornpong y col. (386), determinaron la expresión de COX-2 (mediante IHQ), así como la significación pronóstica en 196 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix estadios FIGO IB-IIA tratadas mediante histerectomía radical más disección ganglionar (aquellas con metastasis ganglionar, afectación parametrial o margen vaginal afecto recibieron tratamiento adyuvante mediante radioterapia y/o quimioterapia). Con una mediana de seguimiento de 32 meses, encontraron que la sobre-expresión de COX-2 se relacionó con metastasis ganglionar, pero en el análisis multivariante sólo la

afectación parametrial y la invasión del espacio linfovascular (LVSI) fueron predictores independientes para la afectación ganglionar (la expresión de COX-2 sólo se asoció con la afectación ganglionar si la afectación parametrial o LVSI estaban presentes). La expresión de COX-2 no se asoció a la SLE en la muestra global, sin embargo en aquellas pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante, la expresión de COX-2 fue asociada con una menor SLE ($p=0.008$). En éste estudio a pesar de que el punto de corte de sobre-expresión para COX-2 fue bajo ($\geq 10\%$ de células tumorales teñidas), los autores no hallaron una relación significativa entre COX-2 y la SLE en el global de la muestra, pero al analizar al subgrupo de pacientes que no recibieron tratamiento adyuvante si hallaron una asociación, esto quizá demuestre el rol de un adecuado tratamiento (radio-quimioterapia) en la respuesta tumoral en los casos avanzados de la enfermedad (65 pacientes presentaron estadio FIGO IB2-IIA y 33 pacientes presentaron un tamaño tumoral $>4\text{cm}$)

Por otro lado, también existen publicaciones que no han encontrado relación entre la sobreexpresión de COX-2 y el pronóstico, así lo describen (Tabla nº11):

Lee JS, y col. (387), evaluaron la relación entre la expresión de COX-2 mediante IHQ y las características clínico-patológicas, además de la angiogenesis (CD34, densidad de microvasos MVD) y proliferación celular (Ki 67) en 39 pacientes diagnosticadas de adenocarcinoma de cérvix estadios FIGO I-II, tratadas con cirugía entre 1993 y 1999. Encontraron que la expresión de COX-2 se relacionó con el estadio FIGO ($p<0.01$), los tumores que expresaron COX-2 presentaron una alta MVD y alto índice de Ki67. En el análisis univariante de la SG, el estadio FIGO, MVD, y COX-2 obtuvieron significación, sin embargo en el análisis multivariante sólo permanecieron como factores pronósticos el estadio FIGO y MVD. Aunque el punto de corte de sobre-expresión para COX-2 fue bajo ($\geq 10\%$ de células), en el análisis multivariante éste no alcanzó significación estadística. Debemos destacar sobre éste estudio que sólo 2 pacientes presentaron afectación ganglionar, los autores no describieron que anticuerpo utilizaron para determinar COX-2 y no analizaron el performance status como variable.

Chen YJ, y col. (388), determinaron la relación de la expresión de COX-2 (mediante IHQ) y variables clínico-patológicas en 53 pacientes con carcinoma de cérvix estadios FIGO IA-IIB, tratadas entre los años 1999 y 2000 mediante histerectomía radical, disección ganglionar pélvica y muestreo ganglionar para-aórtico. Observaron que la sobre-expresión de COX-2 fue mayor en los adenocarcinomas ($p=0.004$). A su vez hallaron una significativa relación inversa entre la expresión de COX-2 y la profundidad de la invasión estromal ($p=0.02$). Encontraron que la expresión de COX-2 fue mayor en los carcinomas bien diferenciados en comparación a los moderado-pobrementemente diferenciados ($p=0.018$). En éste estudio hay que destacar que los autores encontraron una relación inversa entre la expresión de COX-2 y la profundidad de la invasión estromal, y que la sobre-expresión se presentó con más frecuencia en los carcinomas bien diferenciados, esto indicaría indirectamente que la sobre-expresión de COX-2 se presenta en las fases más iniciales de la evolución de la enfermedad.

Kim JY, y col. (389), evaluaron la significancia pronóstica de la expresión de COX-2 y C-erb2, mediante IHQ en 318 muestras de pacientes con CIN III, carcinomas microinvasivos, carcinomas epidermoides y adenocarcinomas infiltrantes de cérvix, tratadas con cirugía entre los años 1989 y 2001 (4 recibieron quimioterapia

neoadyuvante, 1 quimioterapia adyuvante y 38 radioterapia adyuvante). La puntuación de la expresión de COX-2 se realizó mediante el método semicuantitativo (suma de la intensidad y el área de tinción). Observaron que la sobre-expresión de COX-2 se relaciona con la histología ($p<0.005$, fue más frecuente en los ADC), y con el estadio FIGO ($p<0.05$). Sin embargo no hallaron relación entre la sobre-expresión de COX-2 y la SG. Sobre éste estudio habría que mencionar que los autores no reportaron la media o mediana del tiempo de seguimiento, además perdieron una gran cantidad de pacientes en el seguimiento, y que la gran mayoría de las pacientes con carcinoma infiltrante fueron estadios precoces (95 pacientes: estadios IA1-IB1)

Manchana y col. (390), estimaron la expresión de la COX-2 (mediante IHQ) y la significancia pronóstica en 89 pacientes con carcinoma de cérvix estadio FIGO IB, tratadas con histerectomía y linfadenectomía pélvica (27 pacientes con quimioterapia neoadyuvante) entre los años 1997 y 2002. Objetivaron que la sobre-expresión de COX-2 fue más frecuente en los ADC que en los SCC (86,7% vs. 40,6%, $p<0,05$) y también en las pacientes con metastásis ganglionar (100% vs. 46,4%, $p<0,05$), respecto a la relación con la afectación parametrial obtuvo una tendencia (100% vs. 46,4%, $p>0,05$). La SG y SLE a 5 años en aquellas con sobre-expresión de COX-2 fue 81% y 98% respectivamente y en aquellas sin sobre-expresión fue 92% y 95% respectivamente; $p>0,05$). Respecto a éste estudio, debemos señalar que el punto de corte tomado para catalogar una sobre-expresión de COX-2 fue alto, aún así el 49% de las pacientes presentaron sobre-expresión; aunque el anticuerpo usado, no fue el más común utilizado por otros estudios que si encontraron significación pronóstica para COX-2. Aun así la sobre-expresión de COX-2 se relacionó con la histología (adenocarcinomas) al igual que otros estudios ya descritos anteriormente.

Baltazar y col. (275), evaluaron la sobre-expresión de EGFR y COX-2 mediante IHQ en una serie de 130 casos de carcinoma de cérvix (30 ADS, 50 ADC, 50 SCC), tratadas entre los años 1986 y 2000 (el punto de corte de expresión para COX-2 fue $\geq 5\%$ de células teñidas). Observaron que la expresión de COX-2 fue más frecuente en los ADC que en los SCC o ADS ($p<0.001$), sin embargo no objetivaron una diferencia significativa respecto a la histología cuando se evaluó la expresión conjunta de EGFR y COX-2. A su vez no hallaron una relación entre la expresión de COX-2 o EGFR respecto a la edad al diagnóstico, recurrencia, metastasis a distancia o la presencia de ganglios regionales. De igual modo no hallaron relación entre la expresión de EGFR o COX-2 o su expresión conjunta respecto a la SG. En cuanto a éste estudio debemos mencionar que el anticuerpo utilizado para valorar COX-2 (Ac monoclonal SP21, Neomarkers) es distinto al que ha utilizado la gran mayoría de estudios que si hallaron significación pronóstica para COX-2, y a pesar de haber tomado un punto de corte muy bajo para catalogar la expresión de COX-2, éste no alcanzó significación pronóstica. A su vez los autores no describieron el tratamiento que utilizaron en las pacientes, el tiempo de seguimiento, o el estadio FIGO. Aun así, los autores hallaron que ambas proteínas tienen una expresión específica según el tipo histológico y esto se podría relacionar al comportamiento biológico tumoral.

Lindstrom y col. (276), evaluaron la expresión de 10 marcadores tumorales (entre ellos COX-2 mediante IHQ) y la significación pronóstica en 128 pacientes con carcinoma epidermoide de cérvix estadios FIGO IB-IV tratadas con radioterapia y algunas con cirugía complementaria, entre los años 1984 y 1990, después de estratificar a las

pacientes por estadios IB-IIA vs IIB-IV y con un seguimiento de 10 años; observaron que aquellas con una baja expresión de COX-2 y una alta expresión de CD4+ la SG a 10 años fue 76% vs. 53% (odds ratio 3,73), mientras que en aquellas con p53 ausente y alta expresión de COX-2 la SG fue 42% vs. 71% (odds ratio 0,25), sin embargo ninguno de los marcadores en solitario se relacionó significativamente con la supervivencia. En cuanto a éste estudio debemos destacar que el análisis de la expresión de COX-2 se basó en la intensidad de tinción y no en el porcentaje de células tumorales teñidas como en la mayoría de estudios, a su vez los autores no señalaron el punto de corte considerado como sobre-expresión, las pacientes fueron tratadas con radioterapia sin quimioterapia (no describen las características del tratamiento radioterápico), si bien es cierto las pacientes fueron estratificadas por estadios, no realizaron un análisis multivariante para ratificar que las asociaciones de dichos marcadores (COX-2/CD4+, COX-2/p53) conservaran su valor pronóstico.

Giordano y col. (391), determinaron la expresión de COX-2 y EGFR mediante IHQ, y la presencia de HPV mediante RT-PCR, y su implicancia pronóstica en 110 pacientes con carcinoma de cérvix invasivo estadios pTNM IA-IV tratadas con cirugía (cononización o histerectomía en IA y en los casos avanzados HT+LD ± RT y QT), divididas en 2 grupos (< 60 y >60años). Observaron que el estadio tumoral fue mucho mayor en las pacientes más jóvenes ($p=0.04$) y que la mortalidad fue mayor en el grupo con mayor edad ($p=0.006$). La expresión de COX-2 fue mucho mayor en las pacientes mayores ($p = 0.032$, Fisher test), pero no se relacionó con el estadio, expresión de EGFR, o la presencia de HPV, ni con la SG; en el análisis univariante las pacientes con expresión simultánea de COX-2/EGFR presentaron tasas de supervivencia más bajas que aquellas sin expresión ($p = 0.002$), sin embargo el análisis multivariante no reveló relación significativa entre COX-2 y/o EGFR y la SG. En éste estudio habría que destacar que el punto de corte tomado como expresión de COX-2 fue bajo (>5% de células teñidas), aun así los autores no hallaron un valor significativo a COX-2 en relación a la SG en el análisis multivariante. Por otro lado, los autores no describieron el tiempo de seguimiento, no fueron consideradas como variables clínicas a analizar la afectación ganglionar ni el performance status.

Tabla n°10. Relación entre la expresión COX-2 y el pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix.

Primer autor (referencia)	Método	Punto de corte	sobre-expresión	N° pacientes	Histología	Estadio FIGO	Tratamiento	Seguimiento	Significado clínico
Ferrandina 2002 (380)	IHQ antisuero de conejo COX-2	Densidad integrada ≥24.4±2.4	43%	84	SCC 70 ADC 11 ADS 3	IB 22 IIA 9 IIB 37 III-IV 16	Cx: IB-IIA, ≤4cm En 63 :QT neoady Si RC ---Cx No RC ---RHE	media 20 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.0009) Análisis multivariante ↓ SG (p=0.001)
Kim YB 2002 (381)	IHQ Ac monoclonal primario (Ann Arbor)	≥50% células	28%	75	SCC	IIB	RHE 45-50.4Gy BQT (HDR) 30Gy med DT 84Gy +QT CDDP 100mg/m ² 5FU 1000mg/m ²	mediana 60 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.0003) ↓ SLE(p=0.003) Análisis multivariante ↓ SG (p=0.001) ↓ SLE (p=0.02)
Gaffney 2003 (382)	IHQ Ac monoclonal Alexis -804-112	NM intensidad x distribución	NM	55	SCC 48 ADC 5 ADS 2	IB-II 22 III 17 IV 4	RHE BQT LDR (1-2Fx) med DT 80Gy (80-120Gy)	mediana 24 meses	Análisis univariante SLE (p=0.29) Análisis multivariante ↓ SLE (p=0.012) ??
Kim YB 2004 (383)	IHQ Ac monoclonal primario (Ann Arbor)	≥50% células	30.5% 24% (SCC) 54%(ADC)	105	SCC 84 ADC 21	IIB	RHE 45-50.4Gy BQT (HDR) 30Gy med DT 84Gy (75-102Gy) + QT Idem 2002 (SCC) CDDP/CF/DX(ADC)	mediana 60 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.007) ↓ SLE(p=0.006) Análisis multivariante ↓ SG (p=0.02) ↓ SLE (p=0.005)
Kim GE 2004 (268)	IHQ Ac. policlonal de conejo específico para humano COX-2(Ann Arbor) Ac. monoclonal de ratón EGFR(DAKO)	>10% células	28%	68	SCC	IIB	RHE 45-50.4Gy BQT (HDR) 30Gy med DT 84Gy (75-102Gy) + QT CDDP 100mg/m ² 5FU 1000mg/m ²	mediana 60 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.009) COX2 y ↓ SLE(p=0.001) EGFR Análisis multivariante SG NM ↓ SLE(p=0.03)
Abreviaciones. IHQ (inmunohistoquímica), Ac.(anticuerpo), SCC(carcinomas de células escamosas), ADC(adenocarcinomas), ADS(adenoesquamosos), RHE(radioterapia de haz externo), Cx(cirugía), RC (respuesta completa), BQT(braquiterapia), HDR(alta tasa de dosis), LDR(baja tasa de dosis), Fx (fracciones), QT (quimioterapia), CDDP(cisplatino), 5FU (5 Fluoracilo),CF(ciclofosfamida),DX(Docetaxel);med.DT(media dosis),SG(supervivencia global), SLE(supervivencia libre de enfermedad),NM(no mencionado), NS (no significativo)									

Tabla n°10. Relación entre la expresión COX-2 y el pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix.

Primer autor (referencia)	Método	Punto de corte	sobre-expresión	Nº pacientes	Histología	Estadio FIGO	Tratamiento	Seguimiento	Significado clínico
Chen HH. 2005 (384)	IHQ Ac monoclonal primario (Ann Arbor)	≥ 100	64%	167	SCC	IB 44 IIA 23 IIB 56 III-IVA44	RHE 50.4Gy BQT (HDR) 82pts 2fx/s 64pts 1Fx/s med DT?? + QT (15.6%) CDDP	mediana 54 meses	Análisis univariante ↓ SG (p<0.01) ↓ SLE(p<0.01) Análisis multivariante SG NM ↓ SLE (p=0.01)
Pyo H 2005 (385)	IHQ Ac policlonal de conejo(Ann Arbor) Ac monoclonal de ratón para TP (Oncogene Research)	>30% células	24%	75	SCC	IIB	RHE 45- 50.4Gy BQT (HDR) 30 Gy + QT CDDP 100mg/m ² 5FU 1000 mg/m ²	mediana 60 meses	Análisis univariante ↓ SG (p=0.025) COX2 y ↓ SLE (p=0.0083) TP Análisis multivariante ↓ SG (p=0.03) ↓ SLE (p=0.04)
Khunamornpong 2009 (386)	IHQ Ac policlonal (Diagnostic Biosystem CA)	≥10 % células	48.5%	196	SCC	IB1 131 IB2 38 IIA 27	Cx: HT+ LD ± RHE/QT ady.	mediana 32 meses	Análisis univariante: ↓ SLE (p=0.014) Análisis multivariante ↓ SLE (p=0.008) (subgrupo sin adyuvancia)
Abreviaciones. IHQ (inmunohistoquímica), Ac. (anticuerpo), SCC (carcinoma de células escamosas), ADC (adenocarcinomas), ADS(adenoescamosos), RTE (radioterapia de haz externo), pts. (pacientes), Cx(cirugía), HT+LD (histerectomía más linfadenectomía), BQT(braquiterapia), HDR(alta tasa de dosis), LDR(baja tasa de dosis), Fx (fracciones), QT (quimioterapia), ady. (adyuvante), CDDP(cisplatino), 5FU (5-Fluoracilo); TP (timidina fosforilasa), SG(supervivencia global), SLE (supervivencia libre de enfermedad), NM (no mencionado), NS (no significativo)									

Tabla nº11. No relación entre la expresión de COX-2 y el pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix.

Primer autor (referencia)	Método	Punto de corte	sobre-expresión	Nº pacientes	Histología	Estadio FIGO	Tratamiento	Seguimiento	Significado clínico
Lee JS 2004 (387)	IHQ Ac. usado???	≥10% células	72%	39	ADC	IA 7 IB 25 IIA 3 IIB 4	Cx: HT+LD HT simple RHE o QT ady.	media 67 meses	Análisis univariante: ↓ SG (p=0.007) Correlación con FIGO (p<001)
Kim JY 2005 (389)	IHQ Ac monoclonal primario (Ann Arbor)	área +intensidad ≥3	52% SCC 76% ADC	318	NIC III 60 Microinvasivo 103 SCC 124 ADC 21	IA1-2 43 IB1 52 IB2 9 IIA-B 20	Cx	NM	Análisis SG NS Correlación con histología (p<0.05) y con estadio (p<0.05)
Manchana 2006 (390)	IHQ Ac policlonal COX-2 (Santa Cruz CA)	≥50 % células	49%	89	SCC 69 ADC 15 ADS 5	IB	Cx: HT+LD ± QT neoady.	mediana 59 meses	Análisis univariante : SLE NS SG NS
Baltazar 2007 (275)	IHQ Ac monoclonal SP21 (Neomarkers Fremont CA)	≥5% células	75%	130	50 SCC 50 ADC 30 ADS	NM	NM	NM	Análisis SG NS (p= 0.486) Correlación con histología (p<0.001)
Lindstrom 2007 (276)	IHQ Ac monoclonal SP21 (Neomarkers Fremont CA)	intensidad NM	19%	128	SCC	IB 54 IIA 14 IIB 18 III 35	RHE ± Cx ady.	global 10 años	Análisis univariante SG: bajo COX2/altoCD4 (p=0.05) bajo COX2/alto p53 (p=0.04) Alto COX2 (p=0.09)
Giordano 2011 (391)	IHQ Ac. monoclonal CX-294 (DAKO)	≥5% células	55%	110	SCC	pT1a ₁ N0 p T4 (TMN)	IA: cono o HT HT radical ± Linfx. ±RHE ± QT ady.	NM	Análisis univariante: Sólo COX2 : SG NS EGFR-COX2 ↓SG (p=0.002) Análisis multivariante: SG NS
Abreviaciones. IHQ (inmunohistoquímica), Ac. (anticuerpo), SCC (carcinomas de células escamosas), ADC (adenocarcinomas), ADS (adenoesquamosos), RTE (radioterapia de haz externo), Cx (cirugía), HT+LD (histerectomía más linfadenectomía), Linfx. (linfadenectomía), NIC (neoplasia intraepitelial cervical), QT (quimioterapia), ady. (adyuvante), SG (supervivencia global), SLE (supervivencia libre de enfermedad), EGFR (Epidermal Grow Factor Receptor), NM (no mencionado), NS (no significativo)									

8. USO DE INHIBIDORES DE COX-2 EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CÉRVIX.

Estudios pre-clínicos apoyan la función que juega la COX-2 en el cáncer de cérvix, Kim y col. (392) objetivaron que el tratamiento de líneas celulares de cáncer cervical humano con aspirina, sulindac, indometacina, disminuyó la proliferación celular y la formación de colonias de forma dependiente de la dosis y el tiempo. Además el tratamiento de estas líneas celulares previo a la radioterapia, incrementó el número de células apoptóticas y se incrementó el efecto radioterápico, esta respuesta anti-tumoral parece estar mediada a través de la represión de bcl-2 y la inducción de la caspasa-3 conduciendo ambos hacia la apoptosis.

El tratamiento de líneas celulares de cáncer de cérvix con celecoxib, un inhibidor específico de la COX-2, condujo a más apoptosis radio-inducida a través de la detención del ciclo celular en fase G₂M, y debido a la inhibición de la reparación del daño celular provocada por la radiación (393,394). Estudios realizados en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello también han demostrado un aumento de la apoptosis y los efectos sinérgicos de celecoxib (395,396).

Dada la posibilidad del uso de los inhibidores de la COX-2 como radio-sensibilizadores, AINEs (predominantemente celecoxib) se han utilizado en una variedad de tumores en pacientes sometidos a radioterapia, incluyendo el carcinoma de cérvix. Es así que Ferrandina y col. (397), encontraron que en las pacientes tratadas con celecoxib, las biopsias tumorales demostraron una disminución de COX-2, Ki67 (un marcador celular de proliferación), y CD31 (un marcador de la angiogénesis), así como una disminución en la densidad de los microvasos; estos datos fueron utilizados como base para dos ensayos clínicos utilizando celecoxib en el cáncer avanzado de cérvix:

El primero publicado en el año 2007, un ensayo fase I-II elaborado por Herrera y col. (398), 31 pacientes con carcinoma de cérvix localmente avanzado (estadios IB-IIA), recibieron radio-quimioterapia basada en CDDP, además de celecoxib (dosis 400 mg, 2 veces/día) durante 2 semanas previas y de manera continua durante la radio-quimioterapia. El estudio se detuvo, debido a las publicaciones sobre los riesgos cardiovasculares asociados al uso de los inhibidores de la COX-2 (399). El 35.5% de las pacientes experimentaron una toxicidad grado 3 o 4, sin objetivarse diferencia alguna en las tasas de respuesta, comparadas con aquellas reportadas previamente al utilizar la radio-quimioterapia sola. Los autores observaron un incremento en la toxicidad tardía (9,7%), por tanto llegaron a la conclusión de que el aumento de la toxicidad en ausencia de algún gran beneficio clínico, probablemente descartaría la investigación adicional de este agente en la enfermedad avanzada de cérvix.

El segundo ensayo se publicó el mismo año, el ensayo 0128 - fase II elaborado por la RTOG (400), este estudio reclutó 84 pacientes con carcinoma avanzado de cérvix, quienes recibieron radio-quimioterapia (CDDP y 5-FU), braquiterapia, además de celecoxib administrado a dosis de 400 mg, 2 veces/día que se prolongó durante 1 año. El 47% presentaron toxicidad grado 3 o 4, y se informó 13% de toxicidad tardía. De manera similar los autores concluyeron que la ausencia de un aumento significativo de la eficacia y la alta toxicidad asociada a celecoxib limita el uso de este agente.

Más prometedora se muestra la quimio-prevención del cáncer con agentes anti-inflamatorios, pues COX- 2 es un promotor precoz en la carcinogénesis. Diversos estudios describen el beneficio del uso de AINEs en la prevención del desarrollo de tumores no sólo colo-rectales, también en el cáncer de mama, cabeza y cuello, próstata y gástrico (401-407).

Steinbach y col. (408), demostraron que celecoxib disminuye los pólipos adenomatosos en los pacientes con poliposis adenomatosa familiar, por tanto disminuye la progresión a cáncer de colon. A pesar que se dio una alerta cardiovascular con ésta clase de medicamentos, diversos meta-análisis no han demostrado un incremento del riesgo cardiovascular (409,410) con excepción del rofecoxib.

Estudios sobre el cuello uterino humano, han objetivado que la sobre-expresión de COX-2 en los CIN visto en la excisión quirúrgica, se asocia a una mayor tasa de recurrencias (411). Un ensayo fase II de rofecoxib, asignó al azar a 16 pacientes a los fármacos frente a placebo y encontró un aumento de la tasa de regresión (25% vs. 12, 5%, $p=0,09$), estos resultados no fueron estadísticamente significativos y el estudio se detuvo antes de tiempo debido a la retirada del mercado de rofecoxib (412).

Farley y col. (413) condujeron un ensayo fase II aleatorizado, controlado doble ciego con placebo y celecoxib en pacientes con CIN 2/3, objetivaron una tasa de respuesta del 75% en el grupo de estudio en comparación con 31% del grupo placebo. Sin embargo, se señaló que durante el período de estudio, el 8% de las pacientes progresaron y otro 16% de las pacientes con displasia severa presentaron recurrencias.

Mientras que algunos pueden cuestionar el valor de la terapia médica para los NIC III, hay muchas ventajas potenciales de éste tratamiento quimiopreventivo. La extirpación quirúrgica de las displasias de alto grado no sólo contribuye a un costo creciente de la atención en salud, también conlleva a un riesgo de sangrado, estenosis cervical, y riesgos perinatales para la paciente (414). Por éstas razones, la terapia médica puede ser una alternativa atractiva, en particular en las mujeres en edad reproductiva.

A su vez en los países en desarrollo, el acceso limitado a los test de Papanicolaou y al tratamiento de la displasia cervical, da a lugar a que las mujeres desarrollen un carcinoma de cérvix en estadio avanzado. Por tanto el diagnóstico mediante la inspección visual directa, seguida de terapia médica podría permitir el tratamiento de enfermedades pre- invasivas en comunidades locales por parte de las enfermeras y otros trabajadores de la salud. Es por ello, que los agentes anti-inflamatorios ofrecen una opción a las terapias tradicionales, las terapias con anti-inflamatorios son de bajo costo y de fácil difusión en áreas de pobre acceso.

A pesar de la promesa del celecoxib como radiosensibilizador en otros tumores, éste se asoció a una importante toxicidad en las pacientes con cáncer de cérvix localmente avanzado (398,400). Sin embargo, el celecoxib ha mostrado potencial como tratamiento médico para la enfermedad pre-invasiva de cuello uterino. Son necesarios estudios respecto a la inhibición de la COX-2 en el tratamiento de la enfermedad de pre-invasiva, pueden desempeñar un papel importante en la prevención del cáncer, particularmente en pacientes inmunocomprometidas y en países en desarrollo .

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

HIPÓTESIS:

Nosotros tenemos la hipótesis que la sobre-expresión aislada y conjunta del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) podría explicar al menos en parte una peor evolución clínica de algunas de éstas pacientes, traduciendo así una mayor agresividad biológica tumoral; y por ello podrían ser útiles como factores pronósticos en nuestras enfermas. A partir de ésta hipótesis nos proponemos los siguientes objetivos:

OBJETIVO PRIMARIO:

Determinar el impacto que tiene la sobre-expresión aislada y conjunta de EGFR y COX-2 en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y en la supervivencia libre de fracaso pélvico (SLFP).

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Describir los niveles de sobre-expresión aislada y conjunta de EGFR y COX-2 en las biopsias de diagnóstico.
2. Correlacionar la sobre-expresión aislada y conjunta de EGFR y COX-2 con los clásicos factores pronósticos como: edad al diagnóstico, estado general (según escala ECOG), tamaño tumoral, estadio FIGO, y la ausencia o presencia de ganglios pélvico ± para-aórticos según pruebas de imagen (TAC y/o RMN y/o PET-TAC)
3. Analizar el patrón de recaída en función de la sobre-expresión aislada y conjunta de EGFR y COX-2.
4. Evaluar la influencia de los clásicos factores pronósticos en la SLE y SLFP.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS:

POBLACIÓN ESTUDIADA

La población estudiada corresponde a las pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix localmente avanzado (CCLA) estadios FIGO IB-IVA, tratadas en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario 12 de Octubre-Madrid, desde enero de 2004 hasta abril de 2013, a las cuales se les realizó de forma prospectiva la determinación de EGFR y COX-2 en las biopsias de diagnóstico. Durante el periodo señalado fueron tratadas 216 pacientes, la evolución de las pacientes fue ciega para el patólogo.

La evaluación inicial del tumor se realizó mediante examen pélvico, colposcopia con toma de biopsia, radiografía de tórax, TAC abdomino-pélvico +/- RMN pélvica (103 pacientes) +/- PET-TAC de estadificación – planificación (41 pacientes). En los casos de sospecha de afectación vesical o rectal se realizó cistoscopia y proctoscopia respectivamente, con toma de biopsia si el caso lo justificaba.

Para la realización del presente trabajo hemos considerado los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

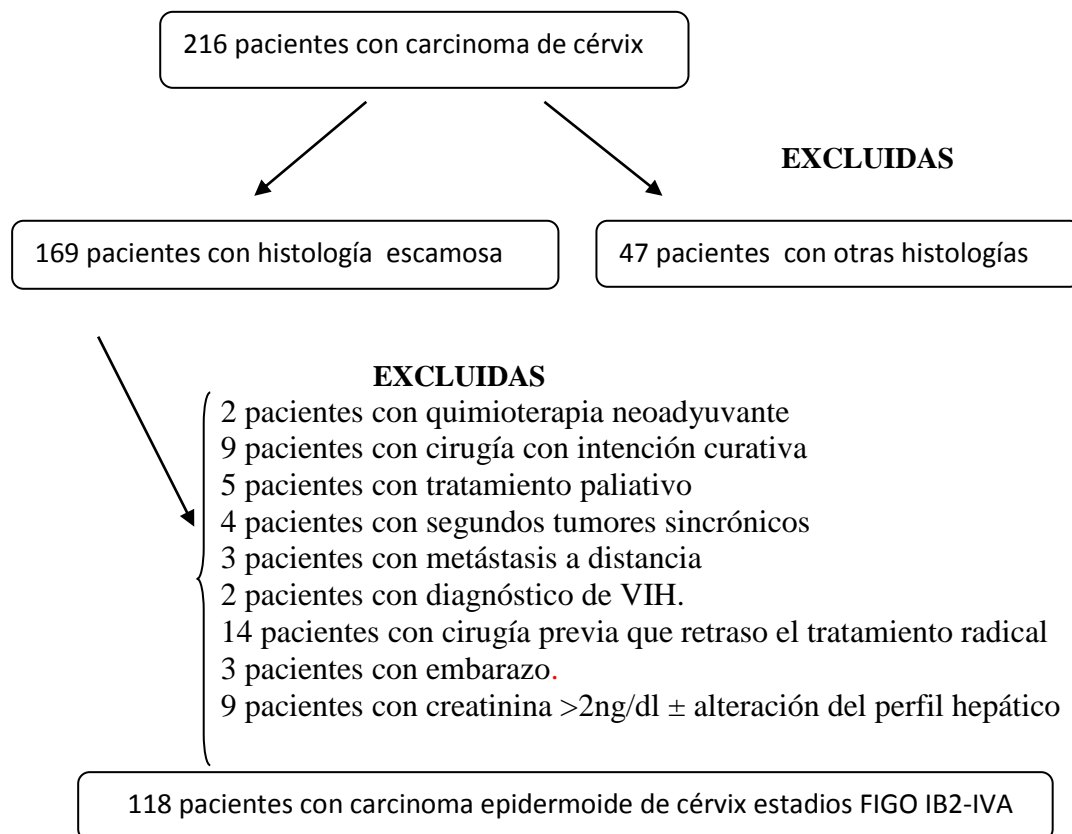
- 1) Pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix mediante biopsia con determinación inmunohistoquímica para EGFR y COX-2.
- 2) Pacientes mayores de 18 años y menores de 85 años.
- 3) Estadios FIGO IB2 –IVA.
- 4) Sólo tumores con histología escamosa.
- 5) Tratamiento radio-quimioterápico con intención radical

Criterios de exclusión:

- 1) Pacientes que no cumplieran con los requisitos necesarios para proceder con el tratamiento estándar de quimioterapia (ej. creatinina >2 mg/dl, alteración del perfil hepático, neutrófilos < 2000 mm³, plaquetas $< 100\,000$ mm³).
- 2) Otros esquemas de tratamiento diferentes a la radio-quimioterapia estándar (ej. quimioterapia neoadyuvante, cirugía previa con intención curativa),
- 3) Intervenciones que retrasarán el inicio del tratamiento radio-quimioterápico (ej. linfadenectomía de estadiaje)
- 4) Presencia de segundos tumores de forma sincrónica.
- 5) Presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (excepto metástasis en ganglios para-aórticos)
- 6) Algún tipo de inmunodeficiencia primaria o adquirida.
- 7) Embarazo asociado al cáncer de cérvix.

Luego de aplicar los criterios de inclusión y exclusión, hemos seleccionado 118 pacientes, a continuación daremos detalle de aquellas pacientes que fueron excluidas de la muestra:

- 47 pacientes por presentar tumores con histologías distintas a la escamosa (37 adenocarcinomas, 4 adenoescamosos, 3 carcinomas indiferenciados, 2 glassy cell, 1 neuroendocrino).
- 2 pacientes por haber recibido quimioterapia neoadyuvante.
- 9 pacientes por cirugía previa con intención curativa.
- 5 pacientes por haber recibido tratamiento radioterápico con intención paliativa.
- 4 pacientes por presentar segundos tumores sincrónicos (1 paciente con carcinoma de cérvix y adenocarcinoma de pulmón, 1 paciente con carcinoma de cérvix y adenocarcinoma renal, 2 pacientes con carcinoma de cérvix y carcinoma de ovario).
- 3 pacientes por presentar metástasis a distancia, estadio IVB (1 paciente con ganglios supraclaviculares, 1 paciente con metástasis en hígado, y otra paciente con adenopatías mediastínicas).
- 2 pacientes por diagnóstico de inmunodeficiencia adquirida (VIH).
- 14 pacientes por cirugía previa, que retrasó el inicio del tratamiento quimio-radioterápico (linfadenectomía de estadiaje)
- 3 pacientes con embarazo (cesárea diferida debido a carcinoma de cérvix asociado al embarazo del 2do trimestre).
- 9 pacientes con creatinina >2mg/dl ± alteración del perfil hepático.



TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO

Primera fase:

Se administró radioterapia pélvica en los todos los casos (dosimetría 3D, 4 campos conformados isocéntricos con energía de fotones de 18 MV, procedentes de un acelerador lineal - Siemens). La dosis al PTV fue de 46 Gy con un fraccionamiento clásico (5x200cGy). En 97 casos (82%) el campo de tratamiento radioterápico se extendió a las para-aórticas (igual forma de administración), la dosis al PTV fue de 45 Gy con un fraccionamiento de 5x180 cGy.

Segunda fase:

Se realizó braquiterapia de baja tasa de dosis (LDR) en 51 pacientes (43.5%) en una sola aplicación, iniciándose el tratamiento entre 1 y 10 días desde la finalización de la radioterapia externa (colpostato utilizado: Delouche® o molde personalizado de Chassagne. Isótopo: Cs-137, proyector de fuentes: Curietron®). La dosis prescrita al punto A fue 30 Gy.

La dosis media administrada con braquiterapia al punto A, fue de 28Gy (mediana =29, p25=21, p75=35). El volumen medio de la isodosis 60 Gy (ICRU 38) fue de 255 cc (mediana 247, p25= 150, p75= 340; r: 30-690). La prescripción de dosis al punto A, usualmente estuvo limitada por la dosis media recibida en recto y/o vejiga (no más de 65-70 Gy con la radioterapia externa y endocavitaria).

Se realizó braquiterapia de alta tasa de dosis (HDR) en 64 pacientes (54%) en 3 o 4 aplicaciones, iniciándose el tratamiento entre 7 y 10 días desde la finalización de la radioterapia externa (molde personalizado de Chassagne. Isótopo: Ir- 192, proyector de fuentes: Microselectron ®). En 33 pacientes fue prescrita una dosis de 30 Gy al punto A, en 31 pacientes fue prescrita una dosis de 7 Gy al CTV, una sesión por semana.

En 3 pacientes (2.5%), no se realizó braquiterapia, otorgándose una dosis añadida con radioterapia externa sobre la pelvis central (dosimetría 3D, 4 campos reducidos conformados isocéntricos con una energía de fotones de 18 MV, procedentes de un acelerador lineal - Siemens). La dosis total acumulada al PTV fue 65-70 Gy, a fraccionamiento clásico (5x180 o 5x200 cGy). La no realización de braquiterapia en estas enfermas, se debió a imposibilidad técnica.

TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO

En las 118 pacientes (100%) se administró quimioterapia concurrente a la radioterapia externa, con un esquema de cisplatino (CDDP): 40 mg/m²/ iv semanal.

En 16 de las 118 pacientes (14%) se administró el último ciclo de cisplatino durante la aplicación de la braquiterapia LDR. No se administró quimioterapia de forma simultánea en ninguna de las sesiones de braquiterapia HDR. El número medio de ciclos de CDDP administrados fue de 5.5 (mediana= 6, rango: 2-7). La media de la dosis total cisplatino administrada por paciente fue de 340 mg. (mediana: 350, p25 = 300, p75 = 380, rango: 120-490).

En las pacientes con respuesta parcial se utilizó quimioterapia de forma precoz cuando el marcador tumoral sérico (antígeno de células escamosas, SCC-Ag.) post finalización del tratamiento marcaba para enfermedad, en ausencia de rash cutáneo o reacción de recall o psoriasis, estas pacientes fueron tratadas con carboplatino-paclitaxel por 6 ciclos.

En aquellas enfermas que presentaron respuesta parcial y el SCC-Ag. normal post tratamiento (pero que había marcado al diagnóstico), se esperó a la revisión de los 3 meses para comprobar el estado de las pacientes. Las pacientes con estabilización-progresión de la enfermedad fueron tratadas de forma sintomática, debido a su mal estado general.

SEGUIMIENTO DE LAS PACIENTES

El seguimiento de las pacientes se realizó cada 3 meses durante los 2 primeros años, luego cada 6 meses durante los 3 años siguientes y a partir del 5º año, una vez al año. En cada visita se realizó un examen físico general, una exploración ginecológica, analítica, así como la evaluación de toxicidad tardía.

Se realizaron una Rx de tórax y TAC de abdomen-pelvis cada 6 meses los cinco primeros años y posteriormente una vez al año. A partir de junio de 2009 se empezó a utilizar el PET- TAC para el estadiaje y planificación de la radioterapia externa (41 pacientes, 30%), así como para la evaluación de la respuesta tumoral (a los 3 meses de finalizar el tratamiento).

La fecha de última visita en el seguimiento de nuestras pacientes finalizó en octubre de 2013, habiéndose perdido 8 pacientes (7 sin tumor y una paciente con tumor). La media del tiempo de seguimiento del total de la muestra fue 56.5 meses \pm DS 10.5 (mediana 56 meses). La media del tiempo de seguimiento de las pacientes perdidas fue 48 meses \pm DS 10.5 (mediana 46 meses).

La evaluación de la toxicidad aguda se realizó según la escala de Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versión 3. La evaluación de la toxicidad tardía se realizó según el RTOG/EORTC Late Radiation Morbidity Scoring Schema.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUIMICO

Fueron seleccionadas las biopsias contenidas en bloques de parafina dónde había muestra tumoral suficiente para un posterior análisis molecular mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). La realización de tales técnicas y su posterior lectura e interpretación fue realizada por el mismo patólogo (Dr. Claudio Ballestín, Hospital Universitario 12 Octubre). El análisis IHQ se realizó de forma prospectiva antes del inicio del tratamiento y fue centralizado, por tanto el patólogo no conoció la evolución de las pacientes.

Todas las biopsias fueron fijadas en formol tamponado e incluidas en parafina. De los bloques obtenidos se cortaron varias secciones de 3 micras sobre portas silanizados, una de ellas se tiñó con Hematoxilina- Eosina para el diagnóstico y las demás se utilizaron para el estudio inmunohistoquímico. Los portas se dejaron a 37° C durante toda la noche. Antes de realizar las técnicas de IHQ, las preparaciones fueron desparafinadas en xilol y alcoholes decrecientes (100°,96°,70°) hasta el agua para hidratar las muestras.

Se empleó un inmunoteñidor automático Tech Mate 500 (Dako; Glostrup. Denmark) usando un sistema strepto-avidina-biotina-peroxidasa optimizado para el teñidor automático (LSAB de Dako).

Medición de EGFR

El anticuerpo utilizado para marcar la proteína de EGFR, fue un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (clon H11 Ref. M-3363 de Dako; Glostrup Dinamarca). Las muestras fueron sometidas a una digestión enzimática con proteasa tipo XXIV (0,5 mg/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

El anticuerpo primario anti EGFR se usó a una dilución de 1/100, con un tiempo de incubación de 30 min a temperatura ambiente. El sistema strepto-avidina-biotina-peroxidasa se aplicó en dos pasos de 20 minutos de incubación cada uno.

El cromógeno empleado fue diaminobencidina, incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente y se aplicó una contratinción con Hematoxilina durante 1 minuto. Controles positivo (utilizando piel) y negativo (sustitución del anticuerpo primario por suero no inmune) fueron incluidos en cada ejecución.

La evaluación de la inmunoreactividad se basó en un análisis semicuantitativo, puntuado como el porcentaje de células teñidas. La expresión de EGFR se consideró valorando la tinción de membrana.

Las biopsias fueron consideradas EGFR (-): si ninguna de las células se teñían, EGFR (+): 1-30 % de las células tenían tinción de membrana, EGFR (++) : 31-69 % de las células tenían tinción de membrana, y EGFR (+++): $\geq 70\%$ de las células tenían tinción de membrana.

A efectos estadísticos, las biopsias con moderada y alta tinción de EGFR (++ y +++, respectivamente) se consideraron positivas en comparación con las de nula o escasa tinción (- y + respectivamente) que se consideraron negativas.

Medición de COX-2

El anticuerpo utilizado para marcar la proteína de COX-2, fue un anticuerpo monoclonal anti-COX-2 (clon CX-2949 Ref. M361 de Dako; Glostrup Dinamarca). Las muestras se incubaron durante 2 minutos a máxima presión, en una olla a presión que contenía 1.5 litros de tampón EDTA pH8.

El anticuerpo primario anti COX-2 se usó a una dilución de 1/50, con un tiempo de incubación de 30 min a temperatura ambiente. El sistema strepto-avidina-biotina-peroxidasa se aplicó en dos pasos de 20 minutos de incubación cada uno.

El cromógeno empleado fue diaminobencidina, incubado durante 10 minutos a temperatura ambiente y se aplicó una contratinción con Hematoxilina durante 1 minuto. Controles positivos (adenocarcinoma colo-rectal) y negativo (sustitución del anticuerpo primario por suero no inmune) fueron incluidos en cada ejecución.

La evaluación de la inmunoreactividad se basó en un análisis semicuantitativo, puntuado como el porcentaje de células teñidas. La expresión de COX-2 se consideró valorando la tinción citoplasmática.

Las biopsias fueron consideradas COX-2 (-): si ninguna de las células se teñían, COX-2 (+): 1-30 % de las células tenían tinción citoplasmática, COX-2 (++) : 31-69 % de las células tenían tinción citoplasmática y COX-2 (+++) : $\geq 70\%$ de las células tenían tinción citoplasmática

A efectos estadísticos, las biopsias con moderada y alta tinción de COX-2 (++ y +++, respectivamente) se consideraron positivas en comparación con las de nula o escasa tinción (- y + respectivamente) que se consideraron negativas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A. Variables del estudio

1. Variables evento:

Evento 1 (cualquier tipo de fracaso): paciente que ha sido tratada con radio-quimioterapia y presenta como primer evento un fracaso ya sea local (pelvis verdadera), regional (sólo adenopatías pélvicas), metastásico a distancia o mixto.

Evento 2 (fracaso pélvico): paciente que ha sido tratada con quimio-radioterapia y presenta como primer evento un fracaso pélvico, entiéndase éste como fracaso local o pelvis verdadera; regional (sólo adenopatías pélvicas); o local más fracaso regional.

2. Variables tiempo:

Tiempo 1- Supervivencia libre de enfermedad: tiempo transcurrido desde la fecha de finalización del tratamiento radioterápico (fecha de la última sesión de braquiterapia; en el caso de no llevar braquiterapia corresponde a la fecha de finalización de la radioterapia externa) hasta la fecha del fracaso, ya sea local, pélvico, metastásico a distancia o mixto. En caso de no suceder el fracaso, tiempo hasta la última revisión o día de fallecimiento.

Tiempo 2- Supervivencia libre de fracaso pélvico: tiempo transcurrido desde la fecha de finalización del tratamiento radioterápico (fecha de la última sesión de braquiterapia; en el caso de no llevar braquiterapia corresponde a la fecha de finalización de la radioterapia externa) hasta la fecha del fracaso pélvico (entiéndase como local, regional o loco-regional). En caso de no suceder el fracaso pélvico, tiempo hasta la última revisión o día de fallecimiento.

3. Variables de estratificación:

Hemos elegido como variables de estudio las siguientes:

- 1) Edad ≤ 50 años vs. >50 años.
- 2) Estado general de la paciente según la escala ECOG, agrupando las enfermas con puntuación 0-1 vs. puntuación 2-3.
- 3) Tamaño tumoral ≤ 6 cm vs. > 6 cm.
- 4) Estadio FIGO, hemos agrupado a las pacientes con estadios IB2-IIA-IIB como grupo 1 vs. las pacientes con estadios III y IVA como grupo 2.
- 5) Presencia vs. ausencia de adenopatías pélvicas y/o para-aórticas en la TAC y/o RMN y/o PET-TAC.
- 6) Expresión de EGFR: Sobre-expresión (tinción para EGFR ++ o +++) vs. no sobre-expresión (tinción para EGFR – o +).
- 7) Expresión de COX-2: Sobre-expresión (tinción para COX-2 ++ o +++) vs. no sobre-expresión (tinción para COX-2 – o +).

B. Análisis de los datos

1. Estadística descriptiva: corresponde a una descripción general de las distintas variables del análisis. Se describe en resumen la información de las variables analizadas, para aquellas que son cualitativas o no numéricas, mediante su distribución de frecuencia absoluta y porcentaje. Las variables numéricas o cuantitativas se describen mediante sus medidas de tendencia central (media, mediana); acompañadas de las medidas de dispersión (desviación estándar, rango intercuartílico).

2. Estadística analítica: Para cada uno de los dos tiempos, tiempo1 y tiempo2, se realizaron los siguientes análisis:

2.1. Análisis univariante:

2.1.1. Tabla de supervivencia:

Describimos el tiempo hasta el evento, desarrollando las curvas de supervivencia mediante el método actuarial y obtenemos la función de probabilidad de supervivencia. Se presentan las probabilidades de supervivencia sucedida a los 3 y 5 años junto a sus respectivos intervalos de confianza al 95%.

2.1.2. Tablas de supervivencia estratificadas:

Se valoró la relación entre los distintos factores o características de las enfermas y el tiempo hasta el evento, estimándose las curvas de supervivencia mediante el método actuarial, presentando en aquellos casos que fue posible la probabilidad de supervivencia sucedida a los 3 y 5 años. La diferencia entre las distribuciones de supervivencia de cada uno de los grupos, en función de una característica de la enferma se valoró mediante la prueba log-Rank. Cada uno de los estudios de supervivencia se acompaña de su gráfica correspondiente.

2.1.3. Regresión de riesgos proporcionales de Cox:

En aquellas variables o características de naturaleza continua se utilizó la técnica de regresión de riesgos proporcionales de Cox; siendo la variable considerada como dependiente “tiempo hasta el evento”, obteniéndose en cada caso una estimación de la fuerza de asociación (hazard ratio) de cada variable, junto a su respectivo intervalo de confianza al 95% y su significación estadística.

2.2. Análisis multivariante:

El estudio se completó con un análisis multivariante, utilizando la técnica de regresión de riesgos proporcionales de Cox; siendo la variable considerada como dependiente “el tiempo hasta el evento”. En el análisis multivariante, se consideraron las variables con resultado significativo ($p < 0.05$) en el análisis univariante; así como aquellas que presentaron una tendencia de significación estadística. Se calcularon los hazard ratio asociados para las variables independientes del modelo final, presentándose junto con sus intervalos de confianza al 95%.

El análisis estadístico fue realizado usando el software SAS v.9.3.

V. RESULTADOS

ANÁLISIS DE LAS PACIENTES

Se estudiaron 118 pacientes diagnosticadas de carcinoma epidermoide de cérvix localmente avanzado, estadios FIGO IB2-IVA no operadas, tratadas entre enero de 2004 hasta abril de 2013 con radio-quimioterapia concurrente con intención curativa; en aquellas pacientes se analizó de forma prospectiva la expresión de EGFR y COX-2 por inmunohistoquímica.

Las características clínicas y del tratamiento administrado se describen en las Tablas nº12,13 y 14.

Las pacientes fueron agrupadas en relación a la expresión de EGFR, 33 pacientes (28%) sin sobre-expresión vs 85(72%) con sobre-expresión; y según la expresión de COX-2, 77 pacientes (65%) sin sobre-expresión vs 41 (35%) con sobre-expresión.

Del total de las biopsias, 29 (24%) fueron [EGFR y COX-2 positivo], 68 (58%) [EGFR positivo y COX-2 negativo ó EGFR negativo y COX-2 positivo] y 21 (18%) [EGFR y COX-2 negativos].

En adelante nos referiremos a aquellas biopsias con sobre-expresión de EGFR (tinción ++/+++) como biopsias EGFR positivas (+) y las que no sobre-expresaron (tinción -/+) como EGFR negativas (-). De igual manera lo haremos con COX-2.

Tabla n° 12. Características clínicas de las pacientes estudiadas (N=118)

<i>Variables estudiadas</i>	<i>Número</i>	<i>(Porcentaje)</i>
Edad al diagnostico		
Mediana (p=percentiles)	53 (p25= 46, p75=64)	
≤50 años	50	(42)
>50 años	68	(58)
ECOG		
0	10	(8.4)
1	90	(76.2)
2	14	(12)
3	4	(3.4)
Estadio FIGO		
IB2-IIA	13	(11)
IIB	44	(37.3)
IIIA-B	52	(44.1)
IVA	9	(7.6)
Tamaño tumoral		
≤ 6 cm	42	(36)
> 6 cm	76	(64)
Ganglios en TAC y/o RMN y/o PET-TAC		
Negativos	61	(52)
Pélvicos positivos	41	(35)
Para-aórticos positivos (+/- pélvicos)	16	(13)
Expresión EGFR		
-	13	(11)
+	20	(17)
++	26	(22)
+++	59	(50)
Expresión COX-2		
-	35	(29.6)
+	42	(36)
++	31	(26)
+++	10	(8.4)
Sobre-expresión conjunta de receptores		
[EGFR y COX-2 negativo]	21	(18)
[EGFR o COX-2 positivo]	68	(58)
[EGFR y COX-2 positivo]	29	(24)

Tabla n° 13. Descripción de los tratamientos administrados

<i>n° pacientes (%)</i>			
Quimioterapia:		Dosis media de cisplatino/paciente	
Cisplatino	118	(100)	340mg (p25=300, p75=380 mg) n° medio de ciclos: 5.5
Radioterapia externa:		Dosis	
Pélvica	21	(18)	46 (5x200 cGy)
Pélvica y para-aórtica	97	(82)	45 Gy (5x180 cGy)
Boost:		Dosis media punto A / Vol. isodosis 60 Gy	
Braquiterapia LDR	51	(43.5)	28 Gy (p25:22,p75:35) /255 cc (r: 30-690cc)
Braquiterapia HDR	64	(54)	3 o 4 sesiones de 7Gy al CTV en 31 pacientes 3 o 4 sesiones de 7Gy al pto. A. en 33 pacientes
RT externa en pelvis central	3	(2.5)	Dosis / Dosis acumulada 15-20 Gy / 65-70 Gy (5x180 o 5x200 cGy)
RT externa en ganglios patológicos (sobreimpresión)	25	(21)	Dosis / Dosis acumulada 10 Gy / 55 Gy

Tabla n°14. Descripción del número de ciclos de Quimioterapia concurrente a Radioterapia (por paciente)

<i>N °ciclos de Qt</i>	<i>N° de pacientes</i>	<i>Porcentaje</i>	<i>Frecuencia acumulativa</i>	<i>Porcentaje acumulativo</i>
2	1	0.85	1	0.85
3	2	1.69	3	2.54
4	11	9.32	14	11.86
5	37	31.36	51	43.22
6	55	46.61	106	89.83
7	12	10.17	118	100.00

RESPUESTA A LA RADIO-QUIMIOTERAPIA CONCURRENTE

Al finalizar el tratamiento, 94 pacientes (80%) presentaron respuesta clínica completa de la enfermedad, 22 (18%) estaban en respuesta parcial y 2 pacientes (2%) presentaron estabilización-progresión de la enfermedad.

De las 22 pacientes con respuesta parcial; en 5 pacientes que al finalizar el tratamiento presentaron una cifra del SCC-Ag. que marcaba para enfermedad y desestimadas para rescate quirúrgico, se les pauto quimioterapia de forma precoz (carboplatino-paclitaxel por 6 ciclos).

En el resto de pacientes, con respuesta parcial y el SCC-Ag. normal post tratamiento (pero que había marcado al diagnóstico), se esperó a la revisión de los 3 meses para comprobar el estado de las pacientes. Las pacientes con estabilización-progresión de la enfermedad fueron tratadas de forma sintomática, debido a su mal estado general.

Se realizó rescate quirúrgico loco-regional en 5 pacientes:

En la primera de forma precoz, a los 3 meses tras la finalización de la radioterapia, se realizó histerectomía extrafascial más linfadenectomía por enfermedad en el cérvix, falleció a los 57 meses posteriores al rescate debido a una segunda recidiva.

En la segunda, debido a recidiva a los 8 meses post finalización de tratamiento (cérvix y parametrio derecho), se realizó exanteración pélvica anterior y posterior, falleció 26 meses después del rescate debido a una segunda recidiva.

En la tercera, por recidiva a los 9 meses post finalización de tratamiento (parametrio derecho, tercio superior de vagina y vejiga), se le realizó exanteración pélvica incluyendo linfadenectomía pélvica, intervención de Bricker y resección de recto-sigma más colostomía, dicha paciente aún continua viva sin tumor, sin signos de recidiva tras 18 meses posteriores al rescate

En la cuarta, por recidiva a los 23 meses post finalización de tratamiento (parametrio derecho, cérvix, útero), se le realizó histerectomía radical tipo IV de Piver más linfadenectomía pélvica y resección tumoral en parametrio derecho, permanece viva con tumor tras 24 meses desde el rescate.

En la quinta, por recidiva a los 33 meses post finalización de tratamiento (adenopatías pélvicas), se le realizó linfadenectomía iliaca bilateral y posterior quimioterapia, permanece viva con tumor (nuevas adenopatías pélvicas) tras 32 meses desde el rescate quirúrgico.

Por último en una paciente con metástasis a distancia (metástasis ósea única en astrágalo derecho) a 15 meses tras finalización de tratamiento radical, se realizó radioterapia externa sobre la metástasis (dosis 60Gy) y quimioterapia concurrente (cisplatino), sin embargo a un año del tratamiento radioterápico debido al aumento del marcador tumoral (SCC-Ag.) y de la captación metabólica del PET-TAC se realizó amputación infratuberositaria del miembro inferior derecho, hasta la fecha de última visita la paciente se encontraba libre de enfermedad.

RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE LAS PACIENTES.

Desde la finalización de la radioterapia hasta la fecha del último seguimiento, 85 pacientes (72%) no presentaron algún tipo de fracaso al tratamiento y 33 pacientes (28%) desarrollaron algún tipo de recaída.

En la fecha del último análisis de seguimiento, 80 pacientes (67.8%) permanecían vivas sin tumor (78 pacientes no fracasaron en ningún momento, 2 fracasaron y se rescataron), 4 pacientes (3.4%) continúan vivas con tumor, 26 pacientes (22%) fallecieron a consecuencia del tumor, 1 paciente (0.8%) falleció sin tumor (debido a toxicidad intestinal crónica, con autopsia negativa para tumor), por último se perdieron 7 pacientes en el seguimiento (6%) (6 pacientes sin tumor y 1 paciente con tumor).

Definimos la Supervivencia Global (SG) como el periodo de tiempo transcurrido (en meses) desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de la última visita o fecha de fallecimiento. La media de la SG del total de la muestra se sitúa en 55 meses \pm DS 20.6 (rango: 9-120).

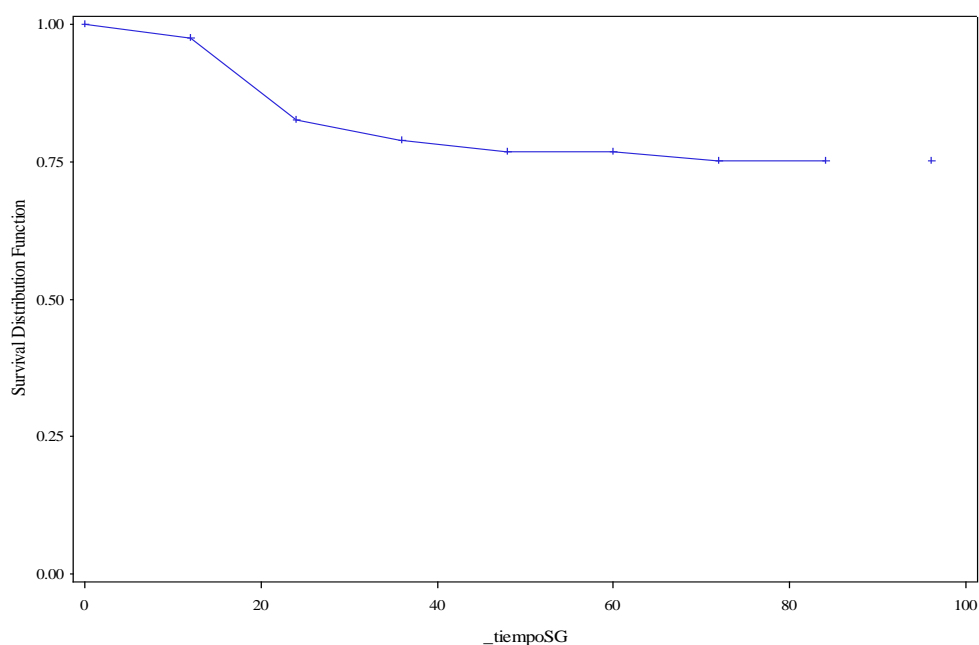
En la Tabla nº15 queda reflejada la SG actuarial a 1, 3, 5 años para el total de la muestra. Observamos que a los 5 años del diagnóstico de cáncer de cérvix, la SG se sitúa en el 77% (Figura nº5).

Tabla nº15. Supervivencia global estimada en intervalos de tiempo

Periodo	SG actuarial %	IC (95%)
1 año	97%	(92-99)
3 años	79%	(70-85)
5 años	77%	(68-84)

SG: Supervivencia global de enfermedad, IC: Intervalos de confianza

Figura nº5. Curva de supervivencia global de las 118 pacientes



Definimos la SLE como el periodo de tiempo transcurrido (en meses) desde la finalización de la radioterapia (braquiterapia) hasta la aparición de una recidiva ya sea local o metástasis a distancia, en el caso de no suceder algún fracaso, comprendería el tiempo hasta la fecha de la última visita. La media de la SLE del total de la muestra se sitúa en 26.4 meses \pm DS 12.3 (rango: 0-115).

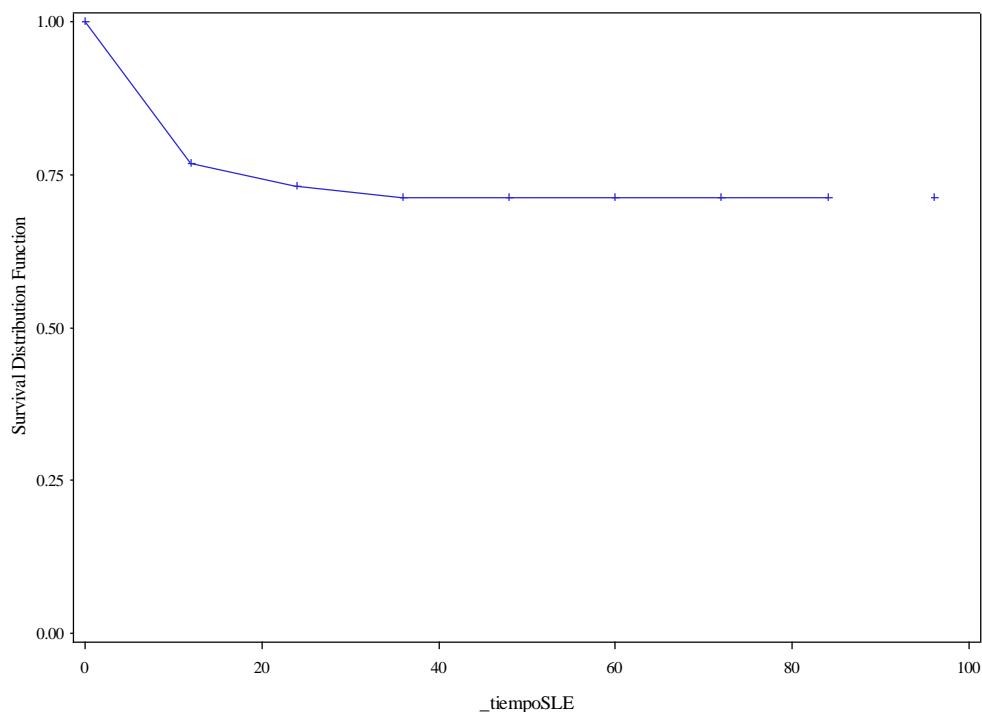
Los resultados que se recogen en la Tabla nº16 reflejan que a 5 años después de la finalización de la radioterapia, el 71% de las pacientes se encuentran en remisión completa de la enfermedad. (Figura nº6).

Tabla nº16. Supervivencia libre de enfermedad estimada en intervalos de tiempo

Periodo	SLE estimada (%)	IC (95%)
1 año	77%	(68-83)
3 años	71%	(62-78)
5 años	71%	(62-78)

SLE: Supervivencia libre de enfermedad, IC: Intervalo de confianza

Figura nº6. Curva de supervivencia libre de enfermedad de las 118 pacientes



La media de la SLE de las 85 pacientes que no fracasaron durante el periodo de seguimiento fue de 64 meses \pm DS 28.3 (rango: 6-115). La media de la SLE de las 33 pacientes con cualquier tipo de fracaso fue de 8.4 meses \pm DS 8.2 (rango: 0-37).

Desde la finalización de la radioterapia, 21 pacientes (18%) presentaron fracaso pélvico. Definimos la SLFP como el periodo de tiempo transcurrido (en meses) desde la finalización de la radioterapia (braquiterapia) hasta la aparición de algún fracaso pélvico (entiéndase como recidiva local y/o pélvica), en el caso de no suceder fracaso pélvico, comprendería el tiempo hasta la fecha de la última visita.

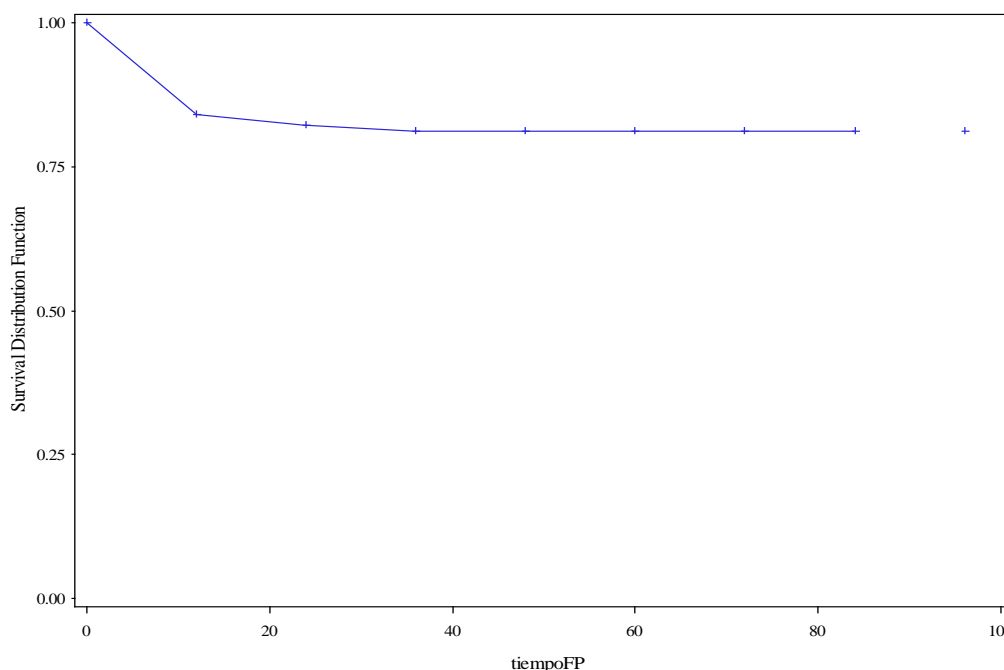
La media de la SLFP del total de la muestra se sitúa en 24 meses \pm DS 10.7 (rango: 0-115). Los resultados que se recogen en la Tabla nº17 reflejan que a 5 años después de la finalización de la radioterapia, el 81% de las pacientes se encuentran libres de fracaso pélvico (Figura nº 7).

Tabla nº17. Supervivencia libre de fracaso pélvico estimada en intervalos de tiempo

Periodo	SLFP estimada (%)	IC (95%)
1 año	84%	(76-89)
3 años	81%	(72-87)
5 años	81%	(72-87)

SLFP: Supervivencia libre de fracaso pélvico, IC: Intervalo de confianza

Figura nº7. Curva de supervivencia libre de fracaso pélvico de las 118 pacientes



La media de SLFP de las 97 pacientes sin fracaso pélvico fue de 58.5 meses \pm DS 30.8 (rango: 2-115). La media de SLFP de las 21 pacientes con fracaso pélvico fue de 7.2 meses \pm DS 7.1 (rango: 0-33). Como es de esperar el patrón temporal de fracaso pélvico fue más precoz que el fracaso a distancia, debido a la persistencia del tumor primario que no respondió al tratamiento y porque la recidiva pélvica es más fácil de diagnosticar mediante biopsia.

RESULTADOS DE TOXICIDAD AGUDA Y TARDIA

Se objetivó toxicidad hematológica aguda grado 3 y 4 en el 9.3% de la muestra (9 y 2 pacientes respectivamente), toxicidad gastrointestinal aguda grado 3 en el 8.5% de la muestra (10 pacientes), toxicidad urinaria aguda grado 3 en el 7.6% de la muestra (9 pacientes). No se hallaron casos de toxicidad gastrointestinal o urinaria aguda grado 4.

En 8 pacientes (6.7%) se suspendió la continuidad de la quimioterapia, debido a persistencia de toxicidad hematológica, éstas pacientes recibieron una media de 3 ciclos (rango 2-5).

En el seguimiento a largo plazo, se halló toxicidad gastrointestinal tardía grado 3 en 6 pacientes (5%), grado 4 en 1 paciente (0.85%), y grado 5 en 1 paciente (0.85%), aquella paciente falleció a consecuencia de obstrucción intestinal por enteritis radica (autopsia negativa para tumor). A su vez se observó toxicidad urinaria tardía grado 3 en 10 pacientes (8.5%), no hallandose toxicidad urinaria tardía de grado 4 ó 5.

PATRÓN DE RECAÍDA EN FUNCIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN AISLADA Y CONJUNTA DE EGFR Y COX-2

En la Tabla n°18, se describen los tipos de fracasos que se han producido en nuestras pacientes. Los tipos de recaídas de la enfermedad fueron las siguientes: 13 locales o pelvis verdadera (cérvix \pm parametrios \pm vagina \pm útero), 4 regionales (sólo adenopatías pélvicas); 4 locales más fracaso regional \pm para-aórtico \pm metástasis a distancia; 2 para-aórticos más metástasis a distancia; 1 para-aórtico puro; 9 metástasis a distancia de forma exclusiva.

Tabla n°18. Tipos de fracasos				
Tipos de fracaso	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
1-local (pelvis verdadera)	13	11.02	13	11.02
2-regional (adenopatías pélvicas)	4	3.39	17	14.41
3-local, regional, para-aórtico y metástasis a distancia	4	3.39	21	17.80
4-para-aórtico y metástasis a distancia	2	1.69	23	19.49
5-para-aórtico puro	1	0.85	24	20.34
6-metástasis a distancia	9	7.63	33	27.97
7-sin fracaso	85	72.03	118	100.00

Tipos de fracaso agrupados (Tabla n°19):

-Para el estudio de fracaso pélvico (1-2-3), se ha considerado a aquella paciente que presentó como primer evento cualquier tipo de fracaso pélvico (local \pm regional) asociado o no a otros tipos de fracaso.

-Para el estudio de fracaso a distancia (4-5-6), se ha considerado a aquella paciente que presentó como primer evento cualquier tipo de fracaso a distancia (para-aórtico \pm metástasis a distancia).

Tabla n°19. Tipos de fracaso agrupados				
Tipos de fracaso	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
1,2,3	21	17.80	21	17.80
4,5,6	12	27.97	33	27.97
7	85	61.68	118	100.00

Aunque se objetivó un mayor número de pacientes con sobre-expresión de EGFR asociado a fracaso pélvico en comparación a las que no sobre-expresaron EGFR (21% vs 9%, respectivamente), no alcanzó significación estadística ($p=0.12$, chi square test). No objetivamos diferencia alguna entre la sobre-expresión de EGFR y la no sobreexpresión respecto al fracaso metastásico (9.5% vs 12% respectivamente, $p=0.66$ chi square test).

Tabla n°20. Relación EGFR / Tipo de fracaso agrupados				
Expresión EGFR	Tipo de fracaso agrupados			
Frequency Row Pct	Pélvico	Metastásico	Sin fracaso	Total
EGFR -/+	3 9	4 12	26 79	33
EGFR++/+++	18 21	8 9.5	59 69.5	85
Total	21	12	85	118

Respecto a COX-2, no se observó relación entre la sobre-expresión de ésta y el fracaso pélvico (14.6% vs 19%; $p=0.51$ chi square test). Del mismo modo no se halló relación entre la sobre-expresión de COX-2 y el fracaso metastásico (14.6% vs. 8%; $p=0.24$ chi square test).

Tabla n°21. Relación COX-2 / Tipo de fracaso agrupados				
Expresión Cox-2	Tipo de fracaso agrupados			
Frequency Row Pct	Pélvico	Metastásico	Sin fracaso	Total
Cox-2 -/+	15 19	6 8	56 73	77
Cox-2++/+++	6 14.6	6 14.6	29 71	41
Total	21	12	85	118

En la evaluación de ambos marcadores; EGFR y COX-2 positivos, uno u otro positivo o ambos negativos, no se objetivó una relación estadísticamente significativa entre la expresión de ambos marcadores de forma conjunta y el fracaso pélvico ($p=0.89$, test de Fisher).

Tabla n°22. Relación EGFR-COX-2 con el tipo de fracaso asociado				
Expresión EGFR-COX-2	Tipos de fracasos agrupados			
Frequency Row Pct	Pélvico	Metastásico	Sin fracaso	Total
EGFR y COX-2 negativo	3 14.3	2 9.5	16 76.2	21
EGFR o COX-2 positivo	12 17.7	6 8.8	50 73.5	68
EGFR y COX-2 positivo	6 20.7	4 13.8	19 65.5	29
Total	21	12	85	118

De igual forma no se produjeron diferencias estadísticamente significativas para el fracaso a distancia en función de la expresión de ambos marcadores.

RELACIÓN ENTRE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE EGFR Y/O COX-2 RESPECTO A LAS VARIABLES PRONÓSTICAS CLÁSICAS

Tabla n°23. Relación entre la sobre-expresión de EGFR o COX-2 y las variables pronósticas clásicas							
Variables	Total n=118	<u>Sobre-expresión EGFR (n=96)</u>			<u>Sobre-expresión COX-2 (n= 47)</u>		
		Nº	%	valor <i>p</i>	Nº	%	valor <i>p</i>
Edad				0.01			0.30
≤50 años	50	30	60.0		20	40.0	
>50 años	68	55	80.8		21	30.8	
ECOG				0.08			0.68
0-1	100	69	69.0		34	34.0	
2-3	18	16	88.8		7	38.8	
FIGO				0.66			0.06
IB2-IIA-IIB	57	40	70.1		15	26.3	
III-IVA	61	45	73.7		26	42.6	
Tamaño T.				0.59			0.81
≤6cm	42	29	69.0		14	33.3	
>6cm	76	56	73.6		27	35.5	
Mts. gl.				0.22			0.21
Negativo	61	41	67.2		18	29.5	
Positivo*	57	44	77.1		23	40.3	
Calculado por el chi-square test. Abreviaciones: Tamaño T. (tamaño tumoral). Mts. gl. (metástasis ganglionar). Positivo* (incluye metástasis en ganglios pélvicos y/o para-aórticos)							

En la tabla n° 23, observamos que la sobre-expresión de EGFR se relaciona con la edad >50 años ($p=0.01$, chi-square test). Por otro lado, aunque no alcanzó significación estadística objetivamos una tendencia entre la sobre-expresión de EGFR y la escala ECOG 2 y 3 ($p=0.08$ chi-square test).

Respecto a COX-2, aunque no alcanzó significación estadística, observamos una tendencia entre la sobre-expresión de ésta y el estadio FIGO avanzado (III-IVA) ($p=0.06$; chi-square test).

Tabla n°24. Relación entre la sobre-expresión conjunta de EGFR y COX-2 respecto a las clásicas variables pronósticas

Variables	Total n=118	<u>EGFR y COX-2 (-)</u>		<u>EGFR o COX-2 (+)</u>		<u>EGFR y COX-2 (+)</u>		valor <i>p</i>
		N°	%	N°	%	N°	%	
Edad								0.09
≤50 años	50	13	26.0	24	48.0	13	26.0	
>50 años	68	8	11.7	44	64.7	16	23.5	
ECOG								0.28
0-1	100	20	20.0	57	57.0	23	23.0	
2-3	18	1	5.5	11	61.1	6	33.3	
FIGO								0.02
IB2-IIA-IIB	57	10	17.5	39	68.4	8	14.0	
III-IVA	61	11	18.0	29	47.5	21	34.4	
Tamaño T.								0.83
≤6cm	42	8	19.0	25	59.5	9	21.4	
>6cm	76	13	17.0	43	56.5	20	26.3	
Mts. gl.								0.19
Negativo	61	13	21.3	37	60.6	11	18.0	
Positivo*	57	8	14.0	31	54.3	18	31.5	

Calculado por el chi-square test.
 Abreviaciones: Tamaño T. (tamaño tumoral). Mts. gl. (metástasis ganglionar). Positivo* (incluye metástasis en ganglios pélvicos y/o para-aórticos)

En la Tabla n°24 observamos que al comparar los 3 subgrupos de acuerdo a la sobre-expresión de los marcadores a estudio; la sobre-expresión de EGFR al unirse a COX-2, ha perdido significación estadística respecto a la edad >50 años ($p=0.09$)

Por otro lado objetivamos una relación estadísticamente significativa entre FIGO y la sobre-expresión conjunta de los 2 marcadores ($p=0.02$); observamos que el estadio FIGO más avanzado (III-IVA) se relaciona a la sobre-expresión de ambos marcadores (34.4% vs. 14%)

ANÁLISIS UNIVARIANTE PARA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS ESTUDIADOS

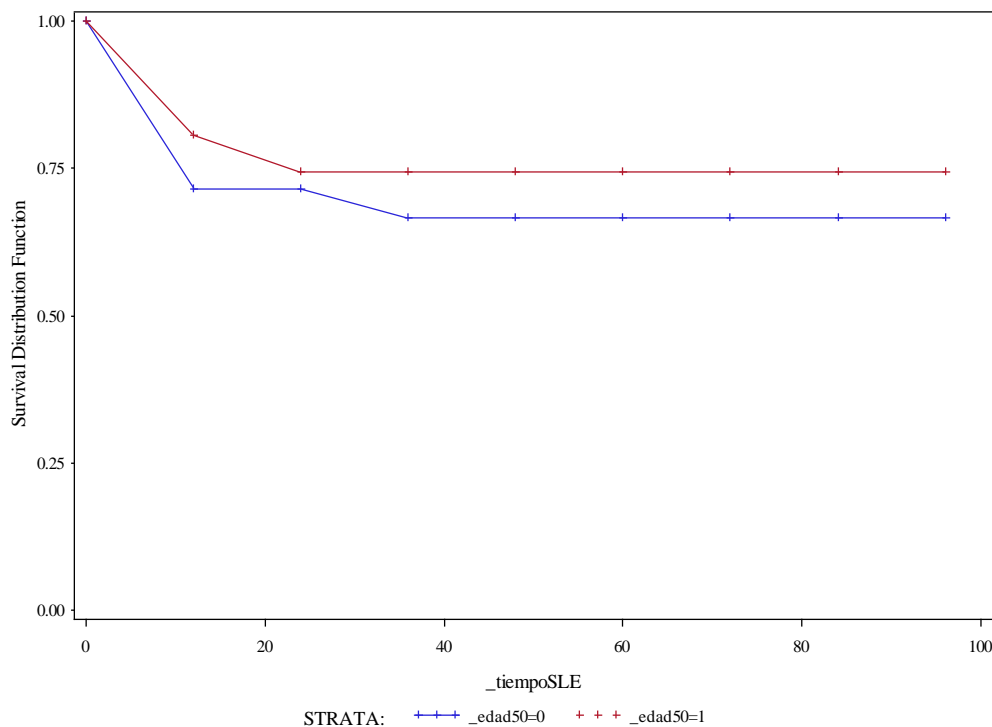
En las 118 enfermas se ha evaluado el valor pronóstico de los clásicos factores clínicos establecidos en la literatura como son: edad, ECOG *performance status*, tamaño tumoral, estadio FIGO, afectación de ganglios linfáticos pélvicos y/o para-aórticos por TAC y/o RMN y/o PET-TAC; y de la sobre-expresión por separado y de forma conjunta de EGFR y COX-2. La influencia de cada uno de ellos en la SLE actuarial a 3 y 5 años en el análisis univariante ha sido la siguiente:

1) Edad: La edad media de las pacientes al diagnóstico fue de 54 años (rango: 29-83).
 SLE a 3 y 5 años ≤ 50 años: 66% y 66% (IC 95% 51-78)
 SLE a 3 y 5 años >50 años: 74% y 74% (IC 95% 62-83)
 $p = 0.39$ (log Rank test)

Tabla nº25. Análisis univariante SLE de la edad (≤ 50 o >50)

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_edad50	Total	Failed	Censored	Percent Censored
≤ 50	0	50	16	34	68.00
>50	1	68	17	51	75.00
Total		118	33	85	72.03

Figura nº8



2) Agrupación por ECOG:

SLE a 3 y 5 años ECOG 0-1: 77% y 77% (IC 95% 67-84)

SLE a 3 y 5 años ECOG 2-3: 38% y 38% (IC 95% 17-60)

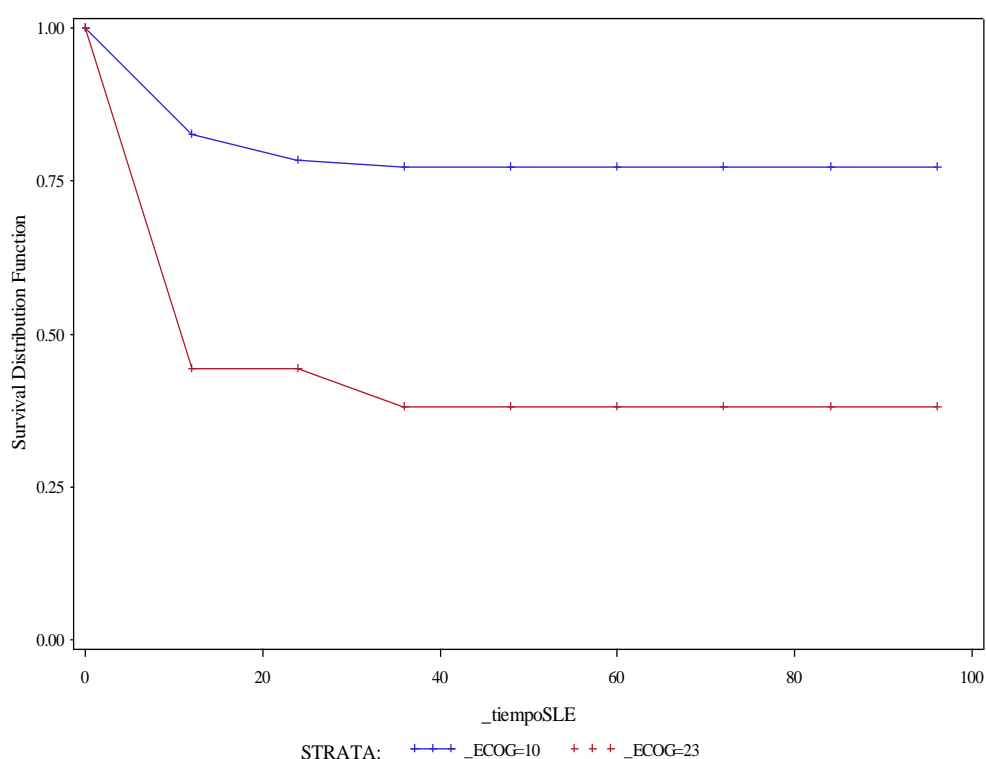
$p < 0.0001$ (log Rank test)

HR para ECOG 2-3= 3.7; IC 95%: 1.8- 7.7 (regresión de riesgos proporcionales de Cox)

Tabla n°26. Análisis univariante SLE de ECOG (0-1 o 2-3)

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_ECOG	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	1,0	100	22	78	78.00
2	2,3	18	11	7	38.89
Total		118	33	85	72.03

Figura n°9



3) Tamaño tumoral: la media del tamaño tumoral fue de 6 cm (rango 3-9.5)

SLE a 3 y 5 años ≤ 6 cm: 81% y 81% (IC 95% 66-90)

SLE a 3 y 5 años > 6 cm: 65% y 65% (IC 95% 53-75)

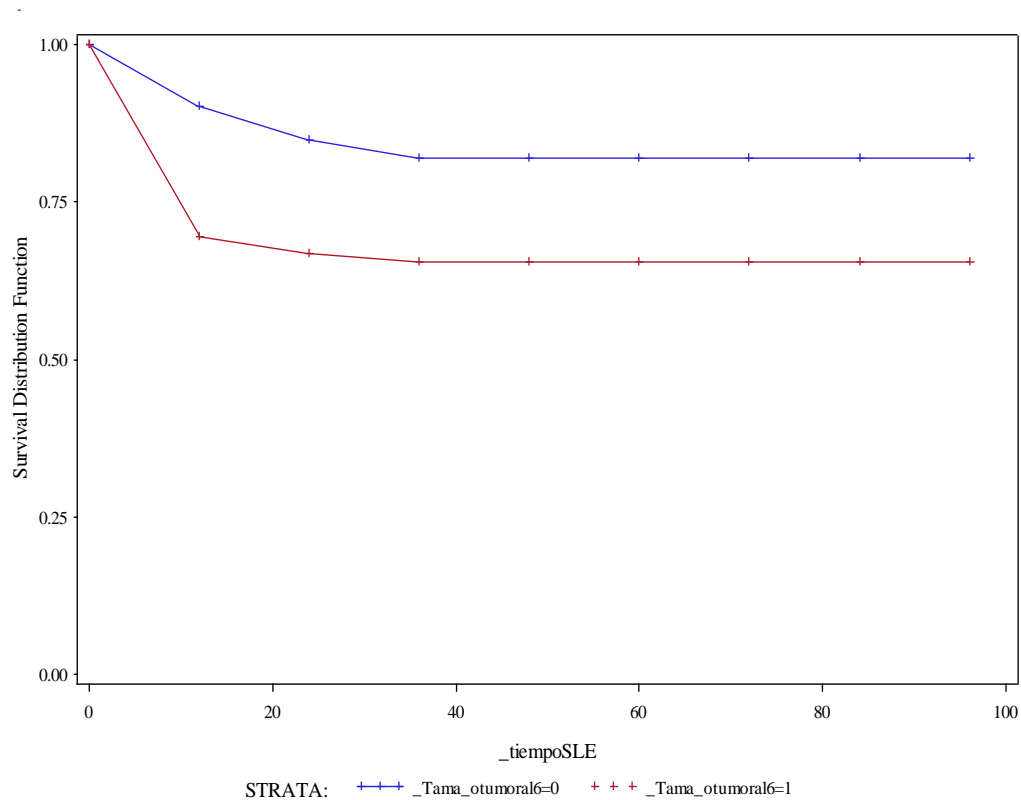
$p=0.04$ (log Rank test)

HR para tamaño tumoral >6 cm= 2.3; IC 95%: 1.2- 5.3 (regresión de riesgos proporcionales de Cox)

Tabla n°27. Análisis univariante SLE del tamaño tumoral (≤ 6 o > 6)

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	Tamaño tumoral	Total	Failed	Censored	Percent Censored
≤ 6	0	42	7	35	83.33
>6	1	76	26	50	65.79
Total		118	33	85	72.03

Figura n°10



4) Agrupación por estadio FIGO:

SLE a 3 y 5 años FIGO IB2, IIA, IIB: 84% y 84%(IC 95%, 71-91)

SLE a 3 y 5 años FIGO IIIA, IIIB, IVA: 60% y 60%(IC 95%, 46-71)

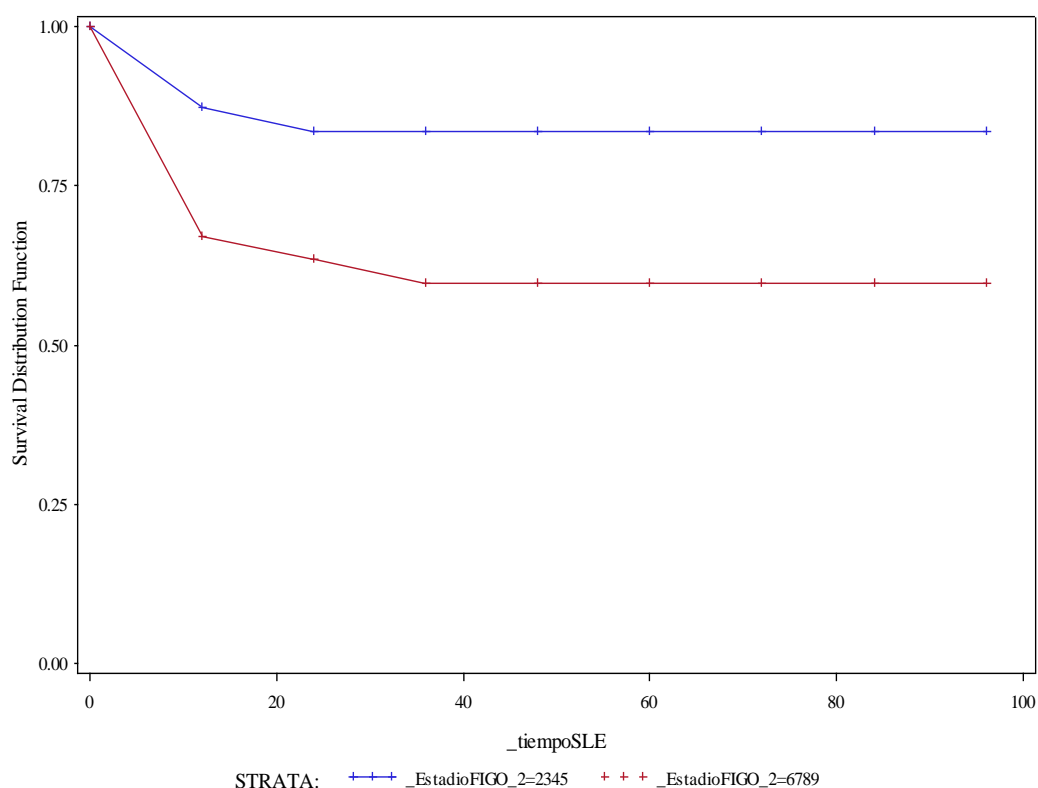
$p < 0.005$ (log Rank test)

HR para el grupo FIGO IIIA, IIIB, IVA= 2.9; IC 95%: 1.4-6.4 (regresión de riesgos proporcionales de Cox)

Tabla n°28. Análisis univariante SLE por estadio FIGO (I-II vs. III-IV)

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_EstadioFIGO_2	Total	Failed	Censored	Percent Censored
IB2-IIB	2345	57	9	48	84.21
III-IVA	6789	61	24	37	60.66
Total		118	33	85	72.03

Figura n°11



5) Agrupación por la presencia de ganglios (pélvicos ± para-aórticos) por TAC y/o RMN y/o PET-TAC:

SLE a 3 y 5 años en pacientes con ganglios negativos N-: 76% y 76% (IC 95%, 63-85)

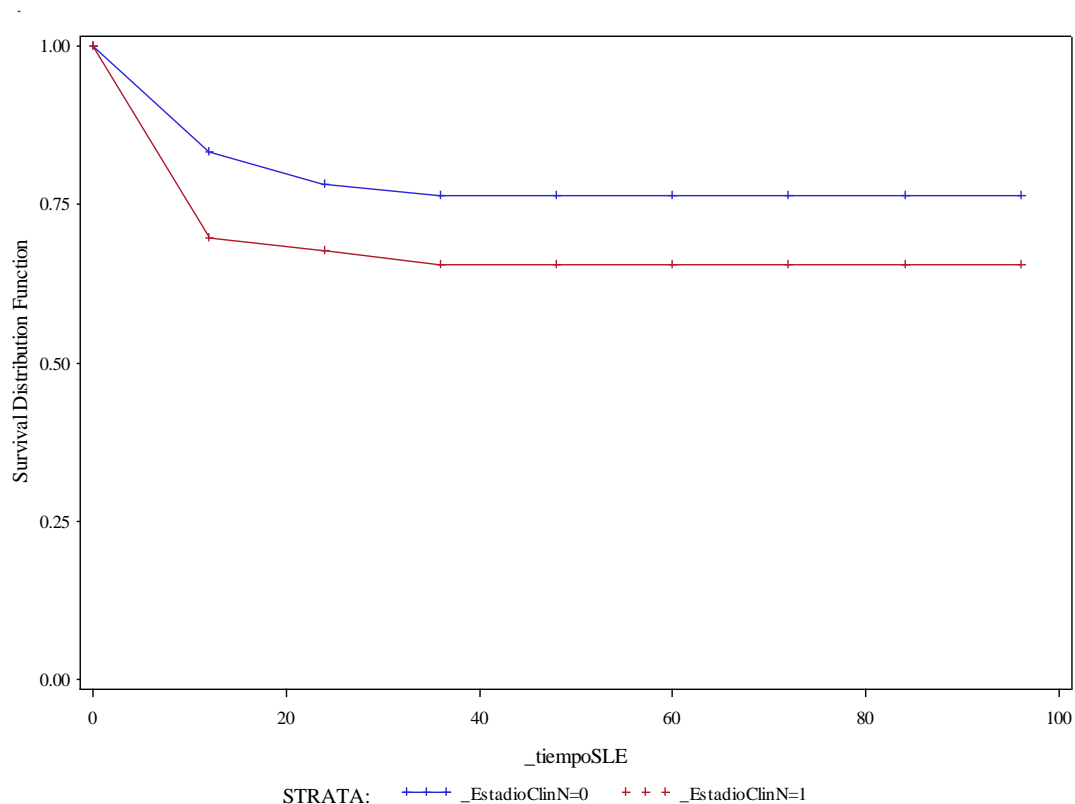
SLE a 3 y 5 años en pacientes con ganglios positivos N+: 65% y 65% (IC 95%, 51-76)

$p=0.18$ (log Rank test)

Tabla n°29. Análisis univariante SLE de afectación ganglionar

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	Estadio Clin N	Total	Failed	Censored	Percent Censored
Negativo	0	61	14	47	77.05
Positivo	1	57	19	38	66.67
Total		118	33	85	72.03

Figura n°12



6) Determinación de EGFR:

SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción EGFR (-): 77% y 77% (IC 95%, 44-92)

SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR (+): 80% y 80% (IC 95%, 55-92)

SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR (++) : 67% y 67% (IC 95%, 45-82)

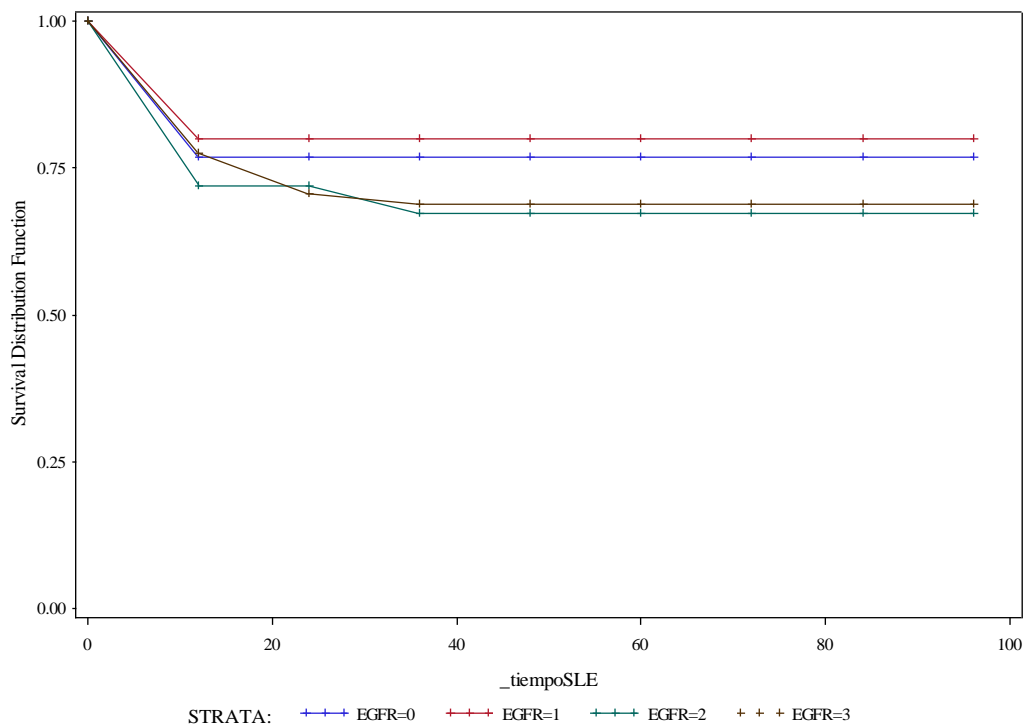
SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR (+++) : 69% y 69% (IC 95%, 55-79)

$p = 0.82$ (log Rank test)

Tabla n°30. Análisis univariante SLE en función a expresión de EGFR

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	EGFR	Total	Failed	Censored	Percent Censored
(-)	0	13	3	10	76.92
(+)	1	20	4	16	80.00
(++)	2	26	8	18	69.23
(+++)	3	59	18	41	69.49
Total		118	33	85	72.03

Figura n°13



Hemos agrupado EGFR en dos grupos: EGFR -/+ (sin sobre-expresión) y EGFR ++/+++ (con sobre-expresión):

SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR -/+: 79% (IC 95%, 60-89)

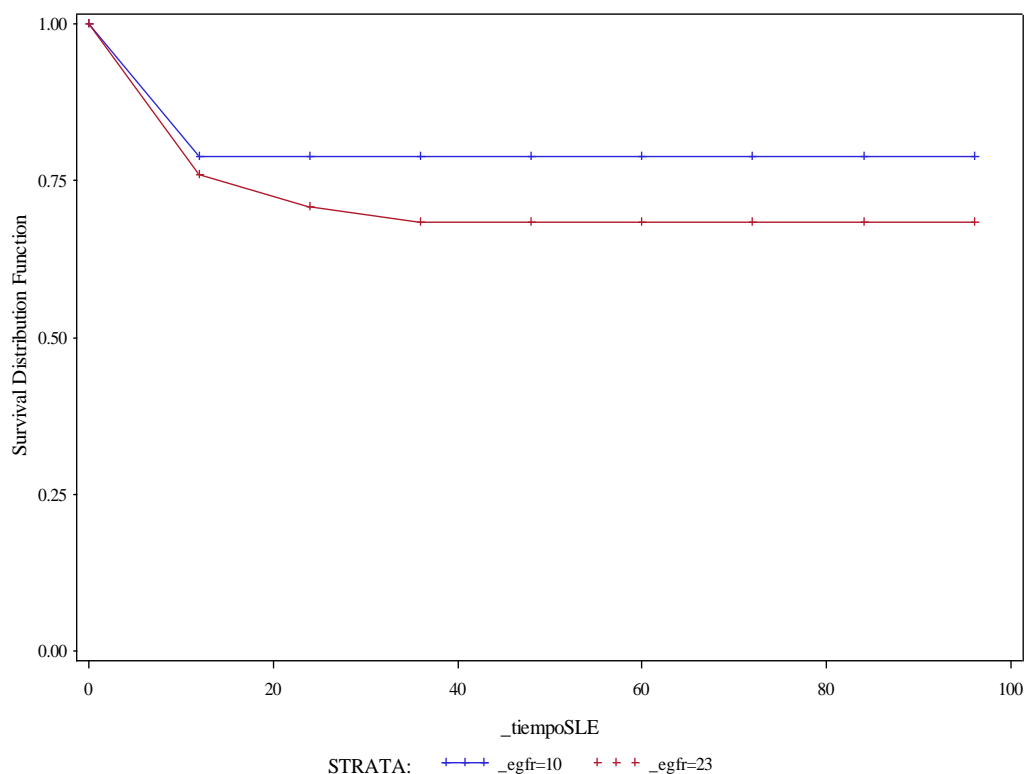
SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR ++/+++ : 68% (IC 95%, 57-77)

$p = 0.36$ (log Rank test)

Tabla n° 31. Análisis univariante SLE en función a EGFR agrupado

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	EGFR	Total	Failed	Censored	Percent Censored
(-/+)	10	33	7	26	78.79
(++/+++)	23	85	26	59	69.41
Total		118	33	85	72.03

Figura n° 14.



7) Determinación de COX-2:

SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de COX-2 (-): 68% y 68% (IC 95%, 49-81)

SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de COX-2 (+): 75% y 75% (IC 95%, 58-86)

SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de COX-2 (++) : 77% y 77% (IC 95%, 57-88)

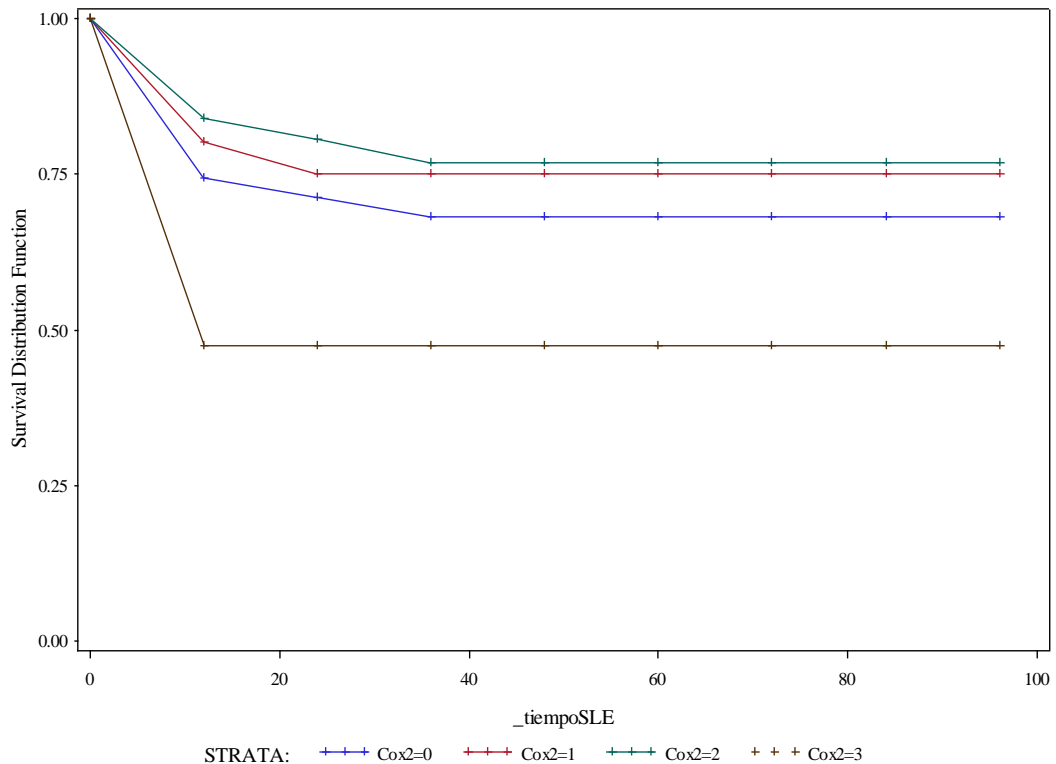
SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de COX-2 (+++) : 47% y 47% (IC 95%, 16-73)

$p = 0.28$ (log Rank test)

Tabla n°32 .Análisis univariante SLE en función a la expresión deCOX-2

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	Cox2	Total	Failed	Censored	Percent Censored
(-)	0	35	11	24	68.57
(+)	1	42	10	32	76.19
(++)	2	31	7	24	77.42
(+++)	3	10	5	5	50.00
Total		118	33	85	72.03

Figura n°15

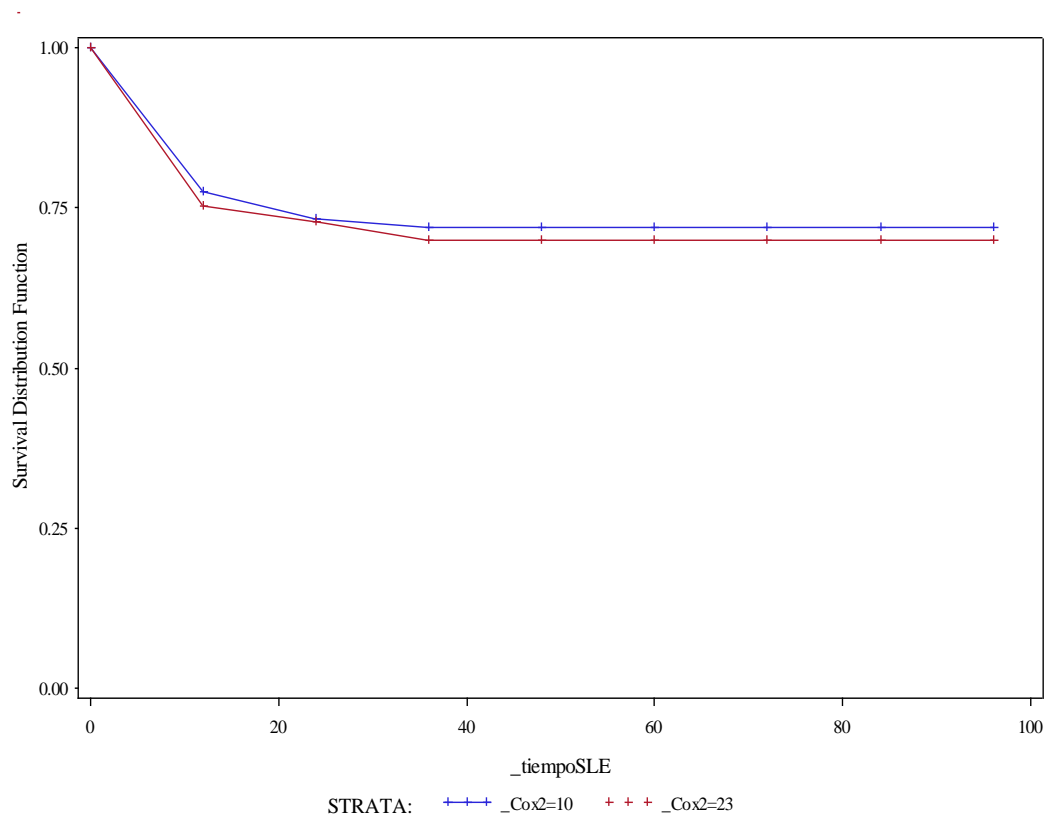


Hemos agrupado COX-2 en dos grupos: COX-2 -/+ (sin sobre-expresión) y COX-2 ++/+++ (con sobre-expresión):
 SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de COX-2 -/+: 72% y 72% (IC 95%, 60-81)
 SLE a 3 y 5 años en pacientes con tinción de COX-2 ++/+++ : 70% y 70% (IC 95%,53-82)
 $p = 0.86$ (log Rank test)

Tabla N°33. Análisis univariante SLE en función a COX-2 agrupado

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_Cox2	Total	Failed	Censored	Percent Censored
(-/+)	10	77	21	56	72.73
(++/+++)	23	41	12	29	70.73
Total		118	33	85	72.03

Figura n° 16



8) En función de la combinación de COX-2 y EGFR agrupados como ambos negativos, uno de los dos positivo y ambos positivos.

SLE a 3 y 5 años en pacientes con [EGFR y COX-2 negativo]: 76% y 76%
(IC 95%, 52-89)

SLE a 3 y 5 años en pacientes con [EGFR o COX-2 positivo]: 73% y 73%
(IC 95%, 60-82)

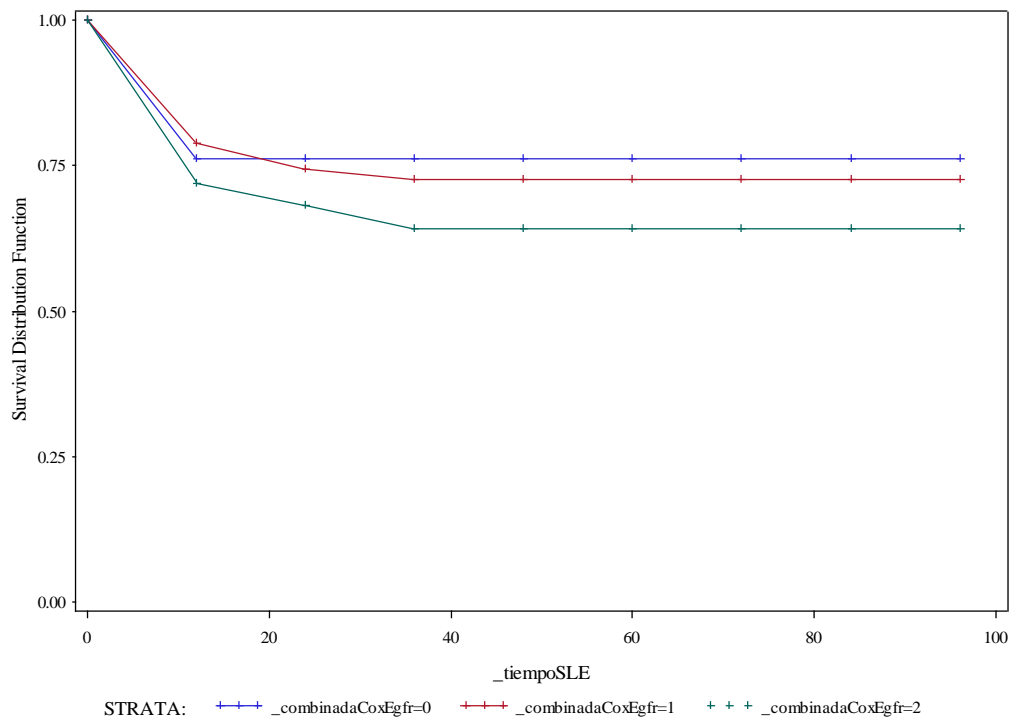
SLE a 3 y 5 años en pacientes con [EGFR y COX-2 positivo]: 64% y 64%
(IC 95%, 44-78)

$p=0.68$ (log Rank test)

Tabla N°34. Análisis univariante SLE en función a COX-2 y EGFR agrupados

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	Combinada EGFR/COX-2	Total	Failed	Censored	Percent Censored
0	EGFR y COX-2 negativo	21	5	16	76.19
1	EGFR o COX-2 positivo	68	18	50	73.53
2	EGFR y COX-2 positivo	29	10	19	65.52
Total		118	33	85	72.03

Figura n°17



ANÁLISIS MULTIVARIANTE PARA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS ESTUDIADOS

El análisis multivariante se realizó con variables que mostraron significación estadística en el análisis univariante. Las variables utilizadas fueron: tamaño tumoral >6cm, estadio clínico avanzado FIGO III-IVA y el estado general según ECOG (2,3). Se han construido varios modelos, contrastando una variable contra otra, y así poder valorar la independencia pronóstica. Hemos utilizado a las 118 pacientes de la muestra para cualquier tipo de fracaso (33 eventos, 85 censurados). Debido a que en el análisis univariante, la sobre-expresión aislada y conjunta de EGFR y COX-2 no alcanzaron significación estadística, no fueron incluidas.

En la Tabla n°35, observamos que al analizar el tamaño tumoral >6m vs. estadio FIGO III-IVA, el tamaño tumoral pierde significación estadística ($p=0,20$).

Tabla n°35 Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
Tamaño tumoral > 6cm	0.20	1.7	0.7	4.1
Estadio FIGO III-IVA	0.02	2.5	1.1	5.6

Luego en la Tabla n°36, al analizar el tamaño tumoral >6cm vs. ECOG 2,3; observamos que nuevamente el tamaño tumoral pierde independencia pronóstica ($p=0,10$).

Tabla n°36 Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
Tamaño tumoral > 6cm	0.10	2.0	0.8	4.6
ECOG 2,3	0.001	3.3	1.6	7.0

Posteriormente en la Tabla n°37, cuando analizamos ECOG 2,3 vs. estadio FIGO III-IVA, el estadio FIGO logra una tendencia ($p=0,06$; HR 2,1)

Tabla n°37 Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
ECOG 2,3	0.01	2.6	1.1	5.7
Estadio FIGO III-IVA	0.06	2.1	0.9	5.0

Por último en la Tabla n°38, observamos que al analizar las 3 variables que alcanzaron significación estadística en el análisis univariante: tamaño tumoral >6cm, ECOG 2,3; estadio FIGO III-IVA, la única variable que permanece con independencia pronóstica es ECOG 2,3 ($p=0,01$; HR 2,6).

Tabla n°38 Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
Tamaño tumoral > 6cm	0.20	1.7	0.7	4.1
ECOG 2,3	0.01	2.6	1.1	5.7
Estadio FIGO III-IVA	0.13	1.9	0.8	4.4

ANÁLISIS UNIVARIANTE PARA SUPERVIVENCIA LIBRE DE FRACASO PÉLVICO DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS ESTUDIADOS

Se ha evaluado el valor pronóstico para la supervivencia libre de fracaso pélvico de los clásicos factores clínicos establecidos en la literatura como son: la edad, ECOG *performance status*, tamaño tumoral, estadio FIGO, afectación de ganglios linfáticos pélvicos \pm para-aórticos por TAC y/o RMN y/o PET-TAC; y de la sobre-expresión por separado y en conjunto de EGFR y COX-2. La influencia de cada uno de ellos en la SLFP a 3 y 5 años en el análisis univariante ha sido la siguiente:

1) Edad.

SLFP a 3 y 5 años ≤ 50 años: 75% y 75% (IC 95%, 60-85)

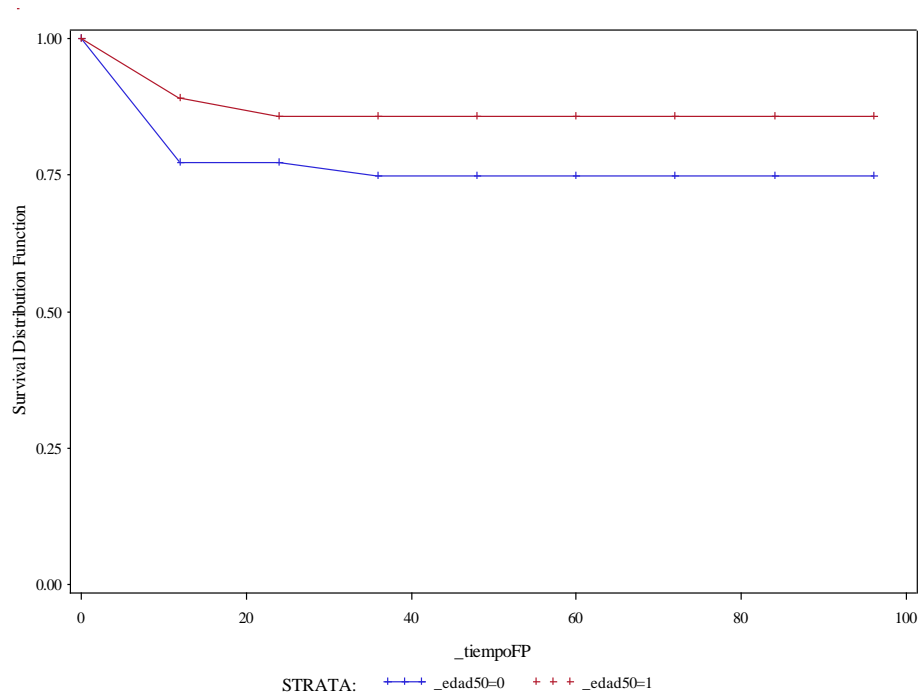
SLFP a 3 y 5 años > 50 años: 86% y 86% (IC 95%, 74-92)

$p = 0.13$ (log Rank test)

Tabla N°39. Análisis univariante SLFP de la edad (≤ 50 o > 50)

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_edad50	Total	Failed	Censored	Percent Censored
≤ 50	0	50	12	38	76.00
> 50	1	68	9	59	86.76
Total		118	21	97	82.20

Figura n°18



2) ECOG *performance status*:

SLFP a 3 y 5 años ECOG 0,1: 85% y 85% (IC 95%, 77-91)

SLFP a 3 y 5 años ECOG 2,3: 54% y 54% (IC 95%, 26-75)

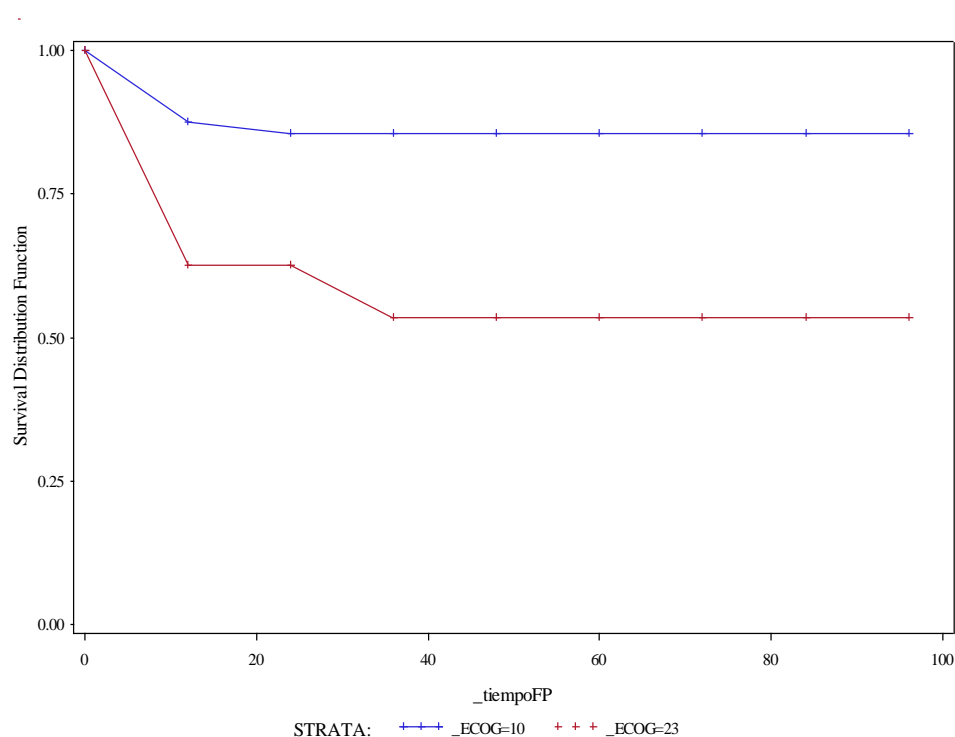
$p < 0.004$ (log Rank test)

HR para ECOG 2,3= 3.5; IC 95%: 1.4 – 8.6 (regresión de riesgos proporcionales de Cox)

Tabla n°40. Análisis univariante SLFP de ECOG (0,1 o 2,3)

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_ECOG	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	1,0	100	14	86	86.00
2	2,3	18	7	11	61.11
Total		118	21	97	82.20

Figura n°19



3) Tamaño tumoral:

SLFP a 3 y 5 años $\leq 6\text{cm}$: 90% y 90% (IC 95%, 76-96)

SLFP a 3 y 5 años $> 6\text{cm}$: 76% y 76% (IC 95%, 64-84)

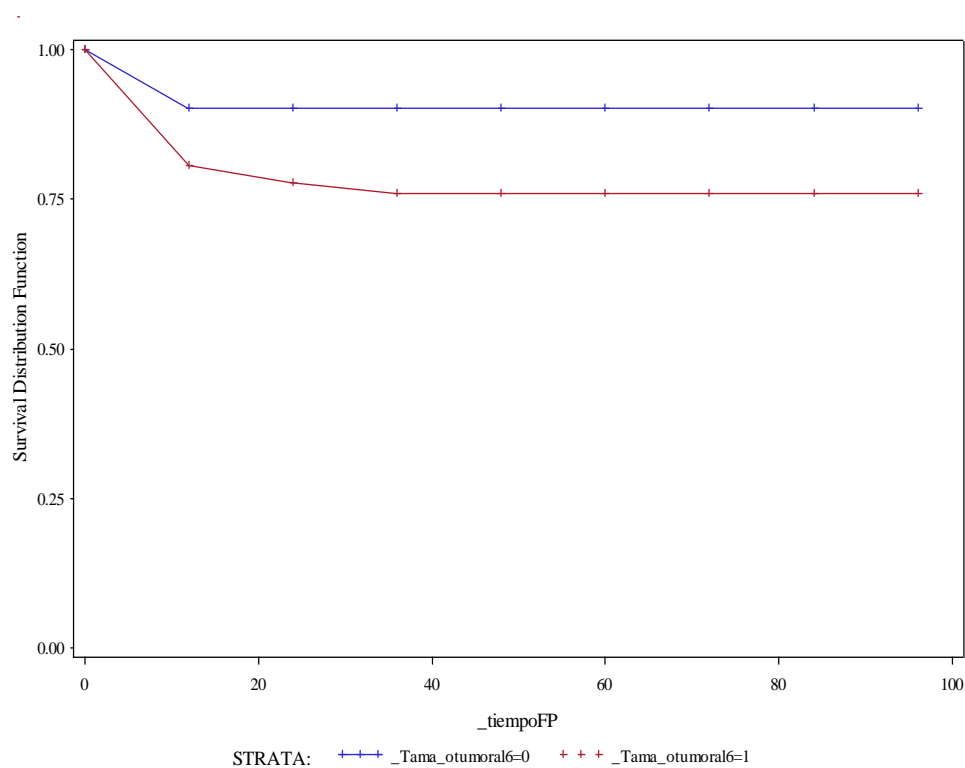
$p = 0.07$ (log Rank test)

HR para tamaño tumoral $>6\text{cm} = 2.6$; IC 95%: 0.9 – 7.6 (regresión de riesgos proporcionales de Cox)

Tabla n°41. Análisis univariante SLFP del tamaño tumoral (≤ 6 o >6)

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_Tama_otumoral6	Total	Failed	Censored	Percent Censored
≤ 6	0	42	4	38	90.48
>6	1	76	17	59	77.63
Total		118	21	97	82.20

Figura n°20



4) Estadio FIGO:

SLFP a 3 y 5 años FIGO IB2, IIA, IIB: 93% y 93% (IC 95%; 82-97)

SLFP a 3 y 5 años FIGO IIIA, IIIB, IVA: 70% y 70% (IC 95%; 56-80)

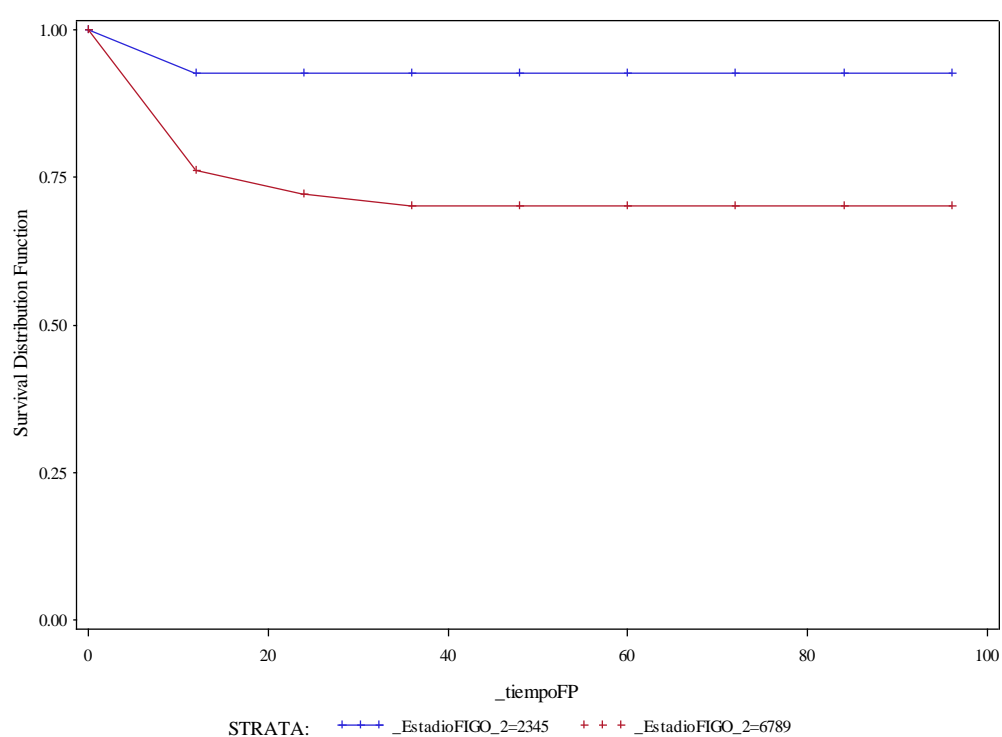
p< 0.002 (log Rank test)

HR para el grupo FIGO III-IVA= 4.6; IC 95%: 1.5-13.6 (regresión de riesgos proporcionales de Cox)

Tabla n°42. Análisis univariante SLFP de FIGO (IB2-IIB o III-IVA)

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_EstadioFIGO_2	Total	Failed	Censored	Percent Censored
2345	IB2-IIB	57	4	53	92.98
6789	III-IVA	61	17	44	72.13
Total		118	21	97	82.20

Figura n°21

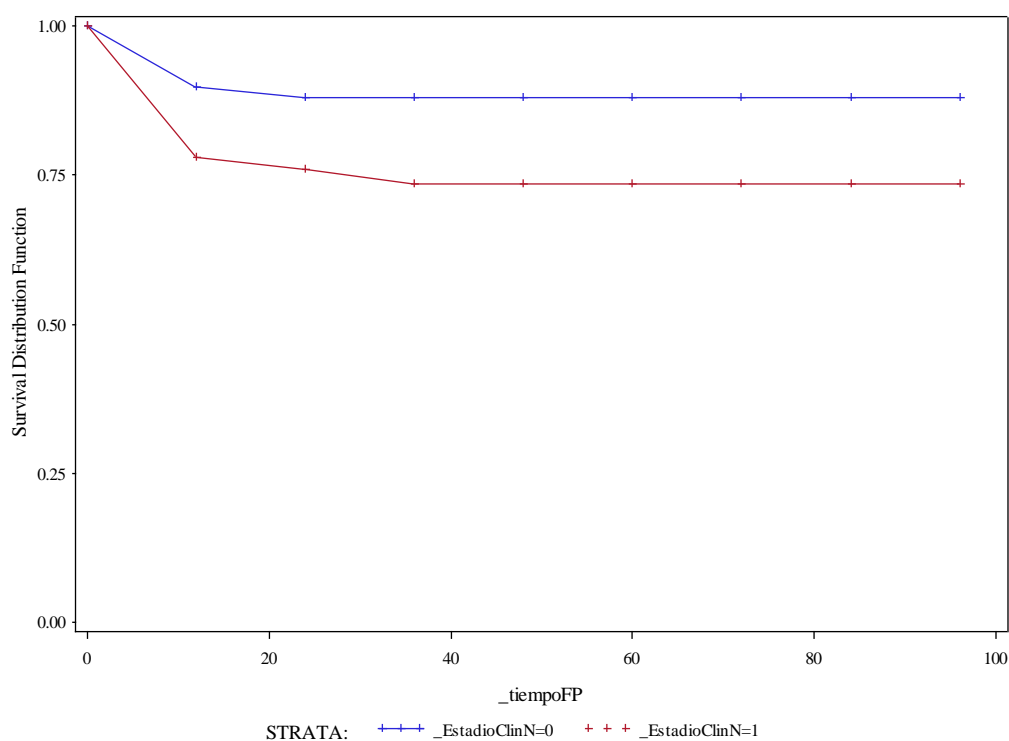


5) Agrupación por la presencia de ganglios por TAC y/o RMN y/o PET-TAC:
 SLFP a 3 y 5 años en pacientes con ganglios negativos N-: 88% y 88% (IC 95%; 76-94)
 SLFP a 3 y 5 años en pacientes con ganglios positivos N+: 74% y 74% (IC 95%; 59-83)
 $p = 0.06$ (log Rank test)
 HR para N+ = 2.3; IC 95%: 0.9- 5.7 (regresión de riesgos proporcionales de Cox)

Tabla n°43. Análisis univariante SLFP de afectación ganglionar

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	Estadio ClinN	Total	Failed	Censored	Percent Censored
Negativo	0	61	7	54	88.52
Positivo	1	57	14	43	75.44
Total		118	21	97	82.20

Figura n°22



6) Determinación de EGFR:

SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR (-): 85% y 85% (IC 95%; 51-95)

SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR (+): 95% y 95% (IC 95%; 68-99)

SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR (++) :71% y 71% (IC 95%; 48-85)

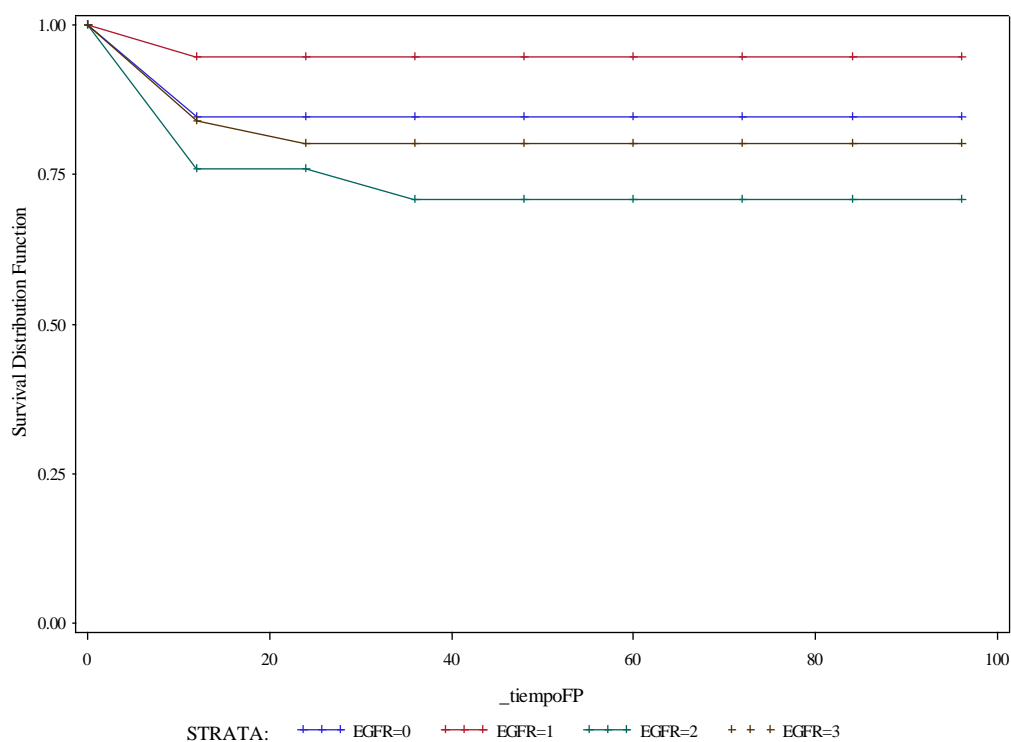
SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción de EGFR (+++) :80% y 80%(IC 95%; 67-88)

$p = 0.32$ (log Rank test)

Tabla n°44. Análisis univariante SLFP de expresión de EGFR

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	EGFR	Total	Failed	Censored	Percent Censored
(-)	0	13	2	11	84.62
(+)	1	20	1	19	95.00
(++)	2	26	7	19	73.08
(+++)	3	59	11	48	81.36
Total		118	21	97	82.20

Figura n°23

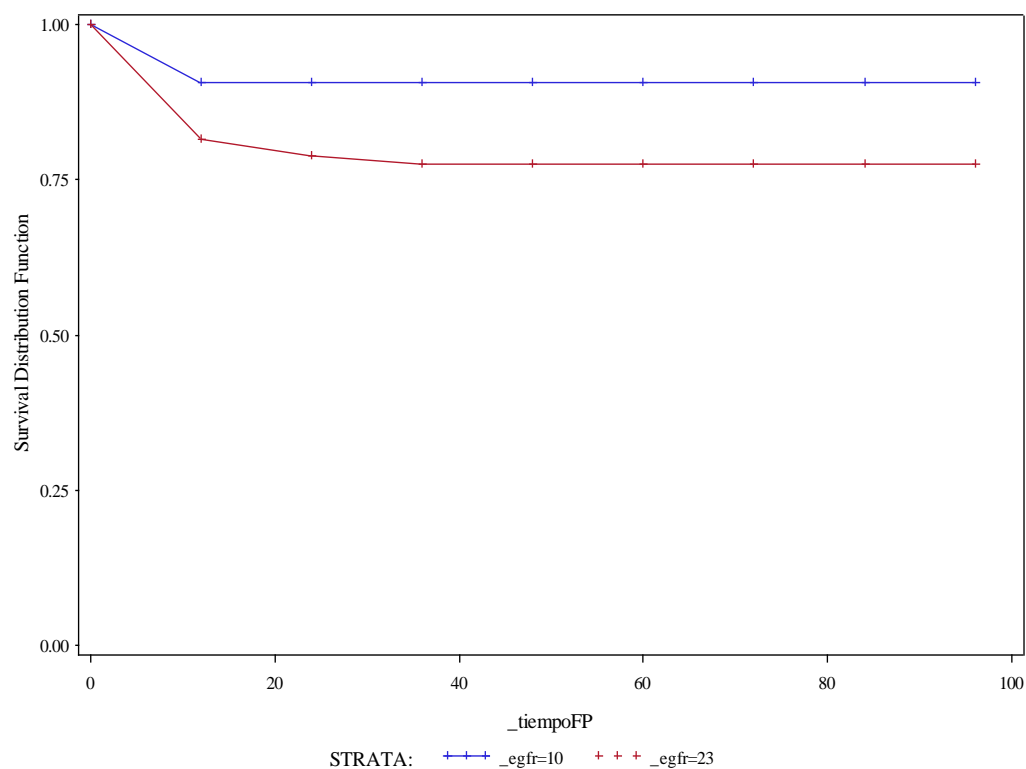


Hemos agrupado EGFR en dos grupos: EGFR -/+ (sin sobre-expresión) y EGFR ++/+++ (con sobre-expresión):
 SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción EGFR -/+: 90% y 90% (IC95%; 74-96)
 SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción EGFR++/+++:77% y 77% (IC95%; 67-85)
 $p = 0.15$ (log Rank test)

Tabla n°45. Análisis univariante SLFP en función EGFR agrupado

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_egfr	Total	Failed	Censored	Percent Censored
(-/+)	10	33	3	30	90.91
(++/+++)	23	85	18	67	78.82
Total		118	21	97	82.20

Figura n°24



7) Determinación de COX-2:

SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción COX-2 (-):76% y 76% (IC95%; 58-87)

SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción COX-2 (+):82% y 82% (IC95%; 66-91)

SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción COX-2 (++) :84% y 84% (IC95%; 65-93)

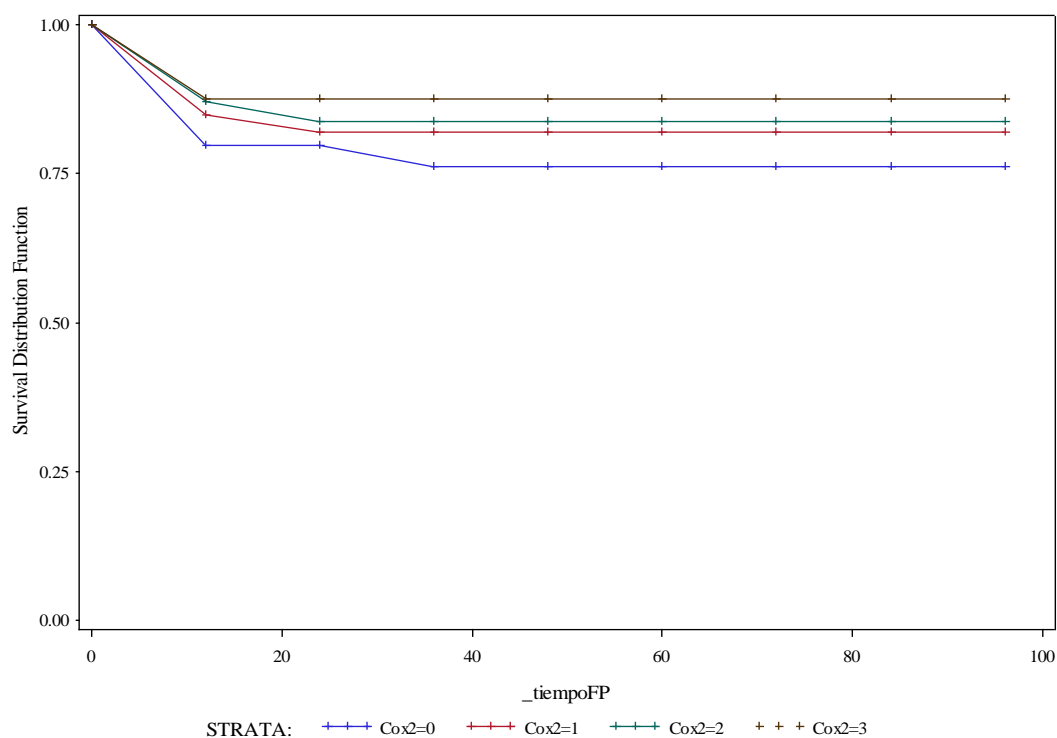
SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción COX-2 (+++) :87% y 87% (IC95%; 39-98)

$p = 0.81$ (log Rank test)

Tabla n°46. Análisis univariante SLFP de expresión de COX-2

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	Cox2	Total	Failed	Censored	Percent Censored
(-)	0	35	8	27	77.14
(+)	1	42	7	35	83.33
(++)	2	31	5	26	83.87
(+++)	3	10	1	9	90.00
Total		118	21	97	82.20

Figura n°25

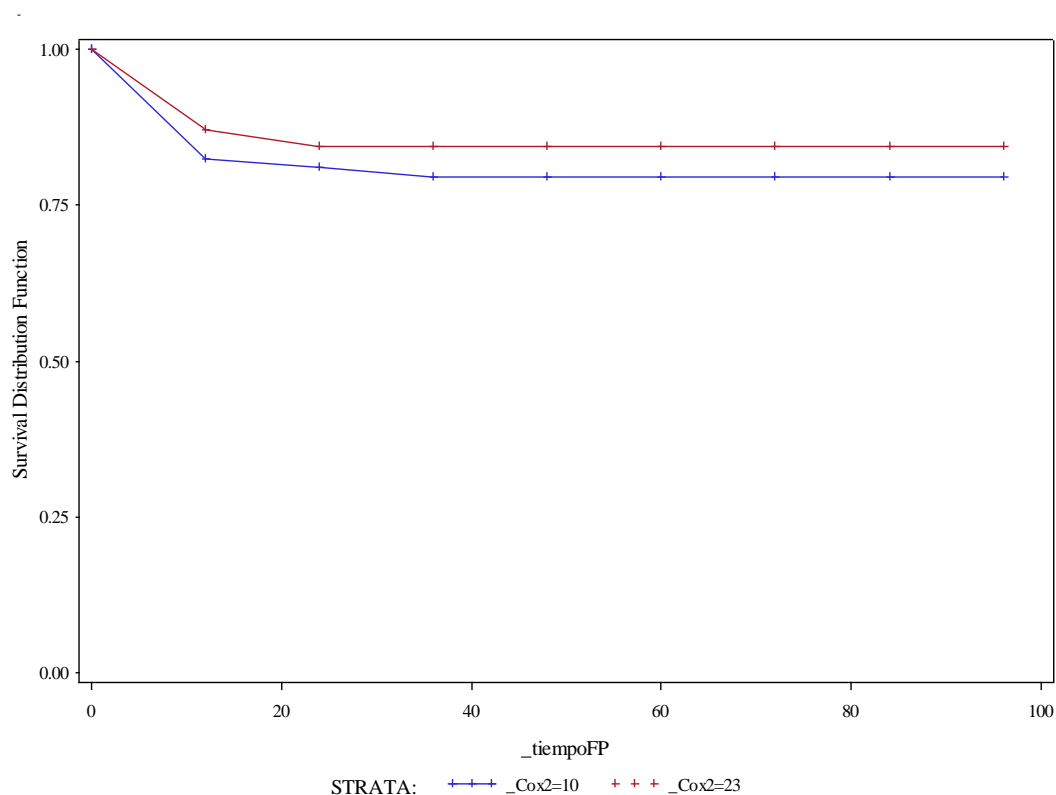


Hemos agrupado COX-2 en dos grupos: COX-2 -/+ (sin sobre-expresión) y COX-2 ++/+++ (con sobre-expresión):
 SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción COX-2 -/+:79% y 79% (IC95%; 68-87)
 SLFP a 3 y 5 años en pacientes con tinción COX-2 ++/+++ :84% y 84% (IC95%; 68-93)
 $p = 0.50$ (log Rank test)

Tabla n°47. Análisis univariante SLFP en función COX-2 agrupado

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_Cox2	Total	Failed	Censored	Percent Censored
(-/+)	10	77	15	62	80.52
(++/+++)	23	41	6	35	85.37
Total		118	21	97	82.20

Figura n°26



8) En función de la combinación de COX-2 y EGFR agrupados como ambos negativos, ambos positivos o uno de los dos positivo y el otro negativo.

SLFP a 3 y 5 años en pacientes con [EGFR y COX-2 negativo]: 85% y 85%
(IC 95%, 61-95)

SLFP a 3 y 5 años en pacientes con [EGFR o COX-2 positivo]: 81% y 81%
(IC 95%, 69-88)

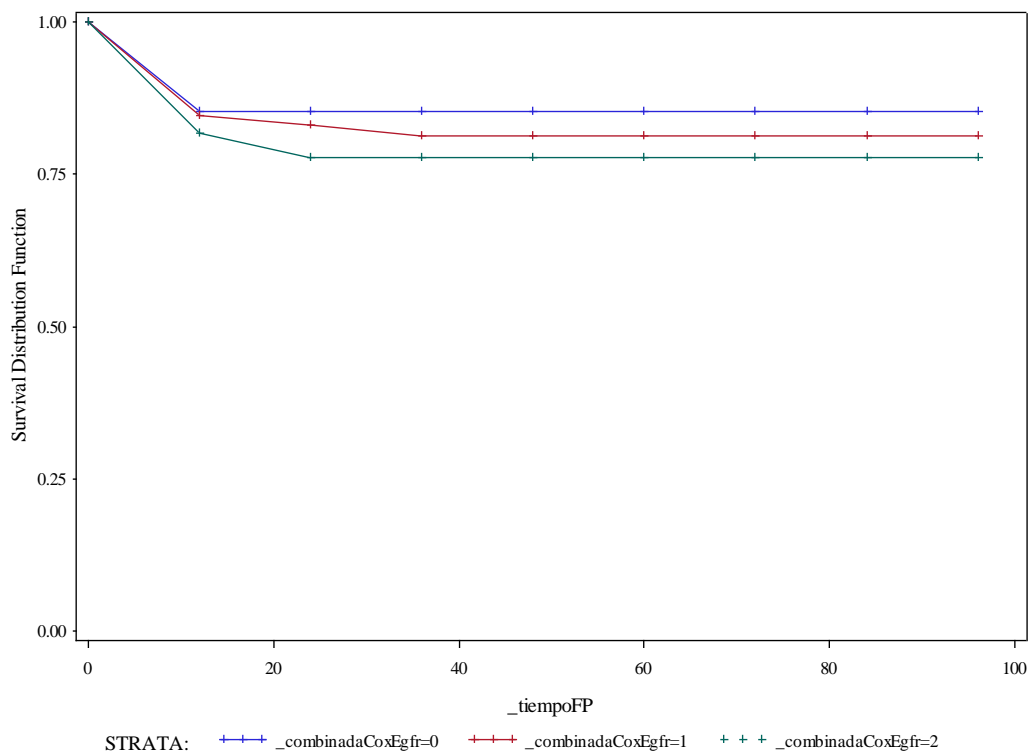
SLFP a 3 y 5 años en pacientes con [EGFR y COX-2 positivo]: 77% y 77%
(IC 95%, 57-89)

$p = 0.87$ (log Rank test)

Tabla n°48. Análisis univariante SLFP en función de COX-2 y EGFR agrupados

Summary of the Number of Censored and Uncensored Values					
Stratum	_combinadaCoxEgfr	Total	Failed	Censored	Percent Censored
0	EGFR y COX-2 negativo	21	3	18	85.71
1	EGFR o COX-2 positivo	68	12	56	82.35
2	EGFR y COX-2 positivo	29	6	23	79.31
Total		118	21	97	82.20

Figura n°27



ANÁLISIS MULTIVARIANTE PARA SUPERVIVENCIA LIBRE DE FRACASO PÉLVICO DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS ESTUDIADOS

Para el análisis multivariante de la SLFP, se han utilizado variables que mostraron significación estadística en el análisis univariante, tales como ECOG 2,3 y estadio FIGO III-IVA; aunque el tamaño tumoral >6cm ($p=0,07$) y estado ganglionar positivo ($p=0,06$) no alcanzaron significación, decidimos incluirlos en el análisis multivariante pues ambos mostraron una tendencia. Se han construido varios modelos, contrastando una variable contra otra, y así poder valorar la independencia pronóstica. Hemos utilizado a las 118 pacientes de la muestra para el tipo de fracaso pélvico (21 eventos, 97 censurados).

Debido a que en el análisis univariante la expresión de EGFR y COX-2 aislada ($p=0.15$; $p=0.50$ respectivamente) y en conjunto ($p=0.87$) no alcanzaron significación estadística, no fueron incluidas como variables a estudio en el análisis multivariante.

En la tabla nº49, hemos analizado el estadio clínico avanzado (FIGO III-IVA) vs. ECOG 2, 3; observamos que ECOG pierde significación estadística ($p=0,13$; HR 2, 0)

Tabla nº49. Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
ECOG 2,3	0.13	2.0	0.7	5.4
Estadio FIGO III-IVA	0.02	3.6	3.6	11.5

Luego en la tabla nº50, observamos que al analizar el tamaño tumoral >6cm vs. estadio clínico avanzado (FIGO III-IVA), el tamaño tumoral se distancia aún más de la significación estadística ($p=0,33$; HR 1, 7), manteniéndose FIGO con valor pronóstico.

Tabla nº50. Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
Tamaño tumoral >6cm	0.33	1.7	0.5	5.3
Estadio FIGO III-IVA	0.01	3.9	1.2	12.1

A continuación en la tabla nº51, analizamos el estadio FIGO avanzado vs. estado ganglionar positivo, observamos que la afectación ganglionar se distancia de la significación estadística ($p=0,28$; HR 1,6) y el estadio FIGO avanzado permanece con valor pronóstico.

Tabla nº51. Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
Estadio FIGO III-IVA	0.01	3.9	1.3	12.2
Estadio Clínico N+	0.28	1.6	0.6	4.2

En la tabla n°52, al analizar el tamaño tumoral >6cm, estadio FIGO avanzado y la afectación ganglionar, observamos que sólo el estadio FIGO mantiene significación estadística.

Tabla n°52. Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
Tamaño tumoral > 6cm	0.37	1.6	0.5	5.1
Estadio FIGO III-IVA	0.03	3.5	1.2	11.0
Estadio Clínico N+	0.31	1.6	0.6	4.0

En la tabla n°53, al analizar el estadio FIGO, afectación ganglionar y ECOG, la única variable que permanece con independencia pronóstica en la SLFP es el estadio FIGO.

Tabla n°53. Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
Estadio FIGO III-IVA	0.03	3.2	1.1	10.4
Estadio Clínico N+	0.29	1.6	0.6	4.1
ECOG 2,3	0.13	2.0	0.7	5.3

Por último en la tabla n°54, al analizar el tamaño tumoral, estadio FIGO, afectación ganglionar y ECOG, la única variable que permanece con independencia pronóstica en la SLFP es el estadio FIGO.

Tabla n°54. Analysis of Maximum Likelihood Estimates				
Parameter	p > ChiSq	Hazard Ratio	Hazard Ratio 95% Confidence Limits	
Estadio FIGO III-IVA	0.04	2.9	1.0	9.5
Estadio Clínico N+	0.34	1.5	0.6	3.9
ECOG 2,3	0.14	2.0	0.7	5.2
Tamaño tumoral >6cm	0.40	1.6	0.5	4.9

VI. DISCUSIÓN

En nuestro estudio, objetivamos 72% de sobre-expresión de EGFR, de manera similar a estudios previos (268, 269, 274, 276, 280) y la sobre-expresión de COX-2 fue 35%, al igual que estudios descritos (380, 383,385).

Los resultados obtenidos (alto porcentaje de expresión de EGFR y moderado porcentaje de expresión de COX-2) podrían explicarse a que según el tipo histológico del cáncer de cérvix existe una mayor o menor predilección de expresión de dichos marcadores.

Es así que según la literatura, la histología escamosa se relaciona con una mayor expresión de EGFR (263, 265, 267, 270, 272, 275, 277, 279) y los adenocarcinomas con una mayor expresión de COX-2 (275, 380, 383, 384, 389, 390), esto de alguna manera nos orientaría a dilucidar que cada oncoproteína tiene una expresión específica según el tipo histológico y esto podría estar relacionado con el comportamiento biológico tumoral.

Entonces teniendo en cuenta la relación que guarda la histología con la expresión de estos marcadores, nuestros resultados estarían influenciados por la inclusión exclusiva de tumores de histología escamosa.

En cuanto al objetivo principal de nuestro estudio, no encontramos valor pronóstico a la sobre-expresión aislada y conjunta de EGFR y COX-2 respecto a la SLE o SLFP.

En la recopilación bibliográfica de los estudios que valoran el valor pronóstico de EGFR encontramos resultados contradictorios; así pues existen estudios que reportan un mal pronóstico cuando las pacientes presentan sobre-expresión de EGFR (Tabla nº7), traducido esto por una menor SG (263, 265-267, 280, 282), una menor SLE (264, 268-270, 280) y una menor SLFP (269, 268); e incluso se han encontrado niveles séricos mayores del EGFR según la progresión de la enfermedad desde un tejido normal, luego CIS y finalmente carcinoma invasivo de cérvix (281); sin embargo existen estudios como el nuestro en el que no se encuentra valor pronóstico a EGFR en el análisis univariante (272, 274, 275, 276, 278, 279, 283; Tabla nº8)

De la misma manera para COX-2, nuestro estudio así como otros (275, 276, 387, 389, 390, 391; Tabla nº11), no encontró relación entre la sobre-expresión de este marcador y un peor pronóstico, sin embargo existen otros que si han hallado dicha relación (Tabla nº10), observando una pobre SG (381, 380, 383, 384, 385) y una peor SLE (381, 382, 384-386).

Referente a los estudios que analizaron la sobre-expresión conjunta de EGFR y COX-2, tenemos los estudios de Kim GE (268) y Giordano (391); los que en el análisis univariante hallaron valor pronóstico a la sobre-expresión conjunta de ambos marcadores objetivando una disminución de la SG; pero sólo Giordano realizó el estudio multivariante, y no confirmó el valor pronóstico de estos. Sin embargo, Kim GE. en el análisis multivariante objetivó una menor SLE en las pacientes con sobre-expresión conjunta de EGFR y COX-2.

Esta diversidad de resultados se podría explicar por la variedad de puntos de corte que se han tomado para denominar una sobre-expresión de EGFR, aquellos estudios que utilizaron un punto de corte bajo encontraron un valor pronóstico a éste (264, 266, 268, 270), y al contrario aquellos que utilizaron un punto de corte alto (274, 276) no hallaron un valor pronóstico.

Otra posible explicación a esta disparidad de resultados, es de que la gran mayoría de estudios que han evaluado la expresión de EGFR (263-270, 272, 274-276, 278, 279) y de COX-2 (268, 275, 276, 380-391) en el cáncer de cérvix mediante técnicas de inmunohistoquímica, no han sido homogéneos en cuanto al uso de anticuerpos y escores semicuantitativos para considerar una sobre-expresión; en otros casos la expresión de EGFR fue medida por técnicas bioquímicas– ELISA (280, 281) con diferentes puntos de corte, por técnicas de radioligando (282, 283), etc.

De igual forma las poblaciones estudiadas han sido muy heterogéneas en cuanto a: tipo histológico, diversidad de estadios tumorales (iniciales, avanzados o ambos), diferentes tratamientos administrados (cirugía, radioterapia externa radical, quimioterapia de inducción seguida de cirugía o de radioterapia externa, etc.).

Asimismo debemos destacar que algunos de los estudios que hallaron valor pronóstico a EGFR y/o COX-2, no evaluaron otras características clínicas que podrían influir en la evolución de la enfermedad, tales como el performance status - ECOG, metástasis ganglionares, etc., tanto en estudios que evaluaron EGFR (264-268, 270,280) como COX-2 (268, 380, 381,382, 383-385).

En nuestro estudio, hemos considerado dichas características en el análisis de las supervivencias, y la posible relación de estas con la sobre-expresión de EGFR y/o COX-2.

Es así que en el análisis univariante para la SLE actuarial a 3 y 5 años, el performance status – ECOG 2-3, el estadio FIGO avanzado (III-IVA) y el tamaño tumoral >6cm alcanzaron significación estadística ($p<0,0001$, $p<0,005$, $p=0,04$ respectivamente); pero en el análisis multivariante sólo ECOG 2-3 permaneció como factor pronóstico independiente ($p=0,01$; HR 2,6; IC 95% 1.1 - 5.7).

En el análisis univariante para la SLFP actuarial a 3 y 5 años, el performance status – ECOG 2-3, el estadio FIGO avanzado (III-IVA) alcanzaron valor pronóstico ($p<0,004$, $p<0,002$ respectivamente) y la afectación ganglionar y tamaño tumoral lograron una tendencia ($p=0,07$, $p=0,06$ respectivamente); sin embargo en el análisis multivariante el estadio FIGO avanzado (III-IVA) fue la única variable que mantuvo independencia pronóstica ($p=0,04$; HR 2,9; IC 95% 1.0-9.5).

A su vez; encontramos una relación con tendencia a la significación entre la sobre-expresión de EGFR y ECOG 2-3 ($p=0,08$); sin embargo no hallamos una relación significativa entre la sobre-expresión aislada de COX-2 o unida EGFR, y ECOG ($p=0,68$ y $p=0,28$, respectivamente).

Por otro lado, hallamos una relación significativa entre la sobre-expresión de EGFR y la edad >50años ($p=0,01$, Tabla nº23), respecto a esta observación, es de interés señalar

que en muchas poblaciones se ha demostrado un segundo pico de prevalencia de los HPV de alto riesgo, entre aquellas mujeres que no erradican su infección por HPV de alto riesgo en la menopausia se produce una transición de infecciones múltiples a un solo tipo de infección, seleccionándose un solo clon viral, conduciendo a un proceso de enfermedad agresiva y progresiva (5) ; y como sabemos en la literatura se ha descrito que la expresión de EGFR está asociada a la infección por HPV (252-257).

Resaltar que encontramos una tendencia a la significación ($p=0.06$) en la relación entre el estadio FIGO avanzado (III-IVA) y la sobre-expresión de COX-2, más aun hallamos una relación significativa entre la sobre- expresión conjunta de EGFR y COX-2 y FIGO avanzado ($p=0.02$, Tabla n°24). Otros estudios que sólo analizaron la sobre-expresión de EGFR respecto a FIGO si hallaron una asociación (265, 270) a diferencia del nuestro.

En cuanto al patrón de fracaso pélvico y/o fracaso a distancia en función de la sobre-expresión aislada y en conjunto de EGFR y COX-2, no hallamos una relación significativa.

En el análisis univariante para la SLE, la metástasis ganglionar (pélvica \pm para-aórtica) no alcanzó valor pronóstico negativo como era de esperar; una posible explicación a este hallazgo es de que además de pautar quimioterapia concurrente, en el tratamiento radioterápico se administró una dosis de sobreimpresión a las metástasis ganglionares en el 44% de los casos (sólo realizamos sobreimpresión de las metástasis ganglionares cuando los ganglios son \geq a 1,5cm de diámetro); además el 82% de las pacientes fueron tratadas con radioterapia extendida a las para-aórticas (34% de manera profiláctica); por todo lo comentado, creemos que las consideraciones tomadas en el tratamiento con radioterapia además de la quimioterapia, posiblemente ha logrado detener y/o eliminar la enfermedad microscópica depositada a nivel ganglionar y de alguna manera influir en mejorar la SLE.

Aunque la metastasis ganglionar alcanzó un valor pronóstico para la SLFP en el análisis univariante, esto no fue ratificado en el análisis multivariante.

En nuestro estudio, a pesar que de nuestras pacientes presentaron tumores localmente avanzados y de características agresivas (64% con un tamaño >6 cm y 48% con afectación ganglionar); se consiguió una SG, SLE, SLFP actuarial a 5 años de 77%, 71% y 81% respectivamente, además el fracaso metastásico como primer evento fue 10.2%; esto es de resaltar, pues es un porcentaje muy bajo a comparación con otros estudios (92, 124,126).

Tras todo lo mencionado, a favor de nuestros resultados en cuanto al valor pronóstico de la sobre-expresión de EGFR y/o COX-2, debemos mencionar que existen estudios de pacientes con carcinoma de cuello uterino que han utilizado fármacos que actúan inhibiendo a EGFR (285, 289, 290,293), a la tirosina-quinasa (286-288) y a COX-2 (398,400) y no han logrado mejorar las supervivencias, lo que indirectamente nos haría pensar que estos marcadores no guardan relación con el pronóstico de la enfermedad, sin embargo el número de estudios es pequeño y con un escaso número de pacientes.

Por otro lado, dentro de las limitaciones encontradas en nuestro estudio, tenemos que nuestra cohorte no es homogénea debido a que reclutamos pacientes con estadios FIGO

IB2 - IVA y que durante el reclutamiento entre los años 2004 al 2013 surgieron cambios en relación al tratamiento radioterápico (84 pacientes fueron tratadas con braquiterapia dirigida al punto A, 51 pacientes con braquiterapia LDR y 33 pacientes con braquiterapia HDR; y 31 pacientes fueron tratadas con braquiterapia HDR al CTV) y al protocolo de diagnóstico (inicialmente TAC \pm RMN, y luego se incluyó además el PET-TAC). Otra limitación encontrada es que nuestra muestra fue pequeña (118 pacientes), sin embargo el porcentaje de pérdidas en el seguimiento fue bajo 6.7%.

A pesar de estas limitaciones, debemos mencionar que nuestro estudio cuenta con un largo tiempo de seguimiento (mediana de 56 meses), incluso en las pacientes pérdidas (mediana de 46 meses); por tanto hemos contado con el tiempo suficiente para detectar eventos.

Además debemos destacar que nuestro estudio no cuenta con sesgos de selección ya que la determinación de EGFR y COX-2 fue de forma prospectiva (antes del inicio del tratamiento) y ciega para el anatómo-patólogo que se encargó de la inmunohistoquímica, además no hemos excluido a las pacientes con ECOG ≥ 2 , por lo tanto el presente trabajo es un reflejo de la práctica clínica diaria.

Otra fortaleza a mencionar es que todas nuestras pacientes recibieron el tratamiento radio-quimioterápico estándar, a diferencia de otros estudios que incluyeron diferentes esquemas de tratamiento sin hacer distinción de éstas (neoadyuvancia con quimioterapia, cirugía, etc.); además el equipo médico que administró el tratamiento fue el mismo.

Por último, nuestro estudio toma en consideración variables clínicas que pueden influir en la evolución de la enfermedad como edad, ECOG, estadio de FIGO, tamaño tumoral y la metástasis ganglionar.

V. CONCLUSIONES

Aunque en el presente estudio no encontramos valor pronóstico a la sobre-expresión de EGFR y/o COX-2 respecto a la SLE y SLFP, en la literatura se describe que estos marcadores juegan un rol en la biología del tumor y al parecer también en su evolución, debido a que se sobreexpresan en función del tipo histológico; y además en nuestro estudio hallamos relación entre la sobre-expresión de estos marcadores y otros clásicos factores pronósticos como la edad, ECOG y estadio FIGO.

Respecto al patrón de recaída (fracaso pélvico o a distancia) en función de la sobre-expresión aislada y conjunta de EGFR y COX-2, no hallamos una relación significativa.

Al evaluar la influencia de los clásicos factores pronósticos en la SLE y SLFP; en el análisis multivariante para la SLE, el único que permaneció como factor pronóstico independiente fue ECOG 2-3, y en el análisis multivariante para la SLFP la única variable que mantuvo independencia pronóstica fue el estadio FIGO avanzado.

Debemos resaltar que gran parte de los estudios que investigaron la sobre-expresión de EGFR y/o COX-2 como factores pronósticos en las pacientes con cáncer de cérvix, lo determinaron mediante técnicas de inmunohistoquímica, sin embargo los anticuerpos utilizados han sido variados, también los scores (cuantitativos, semicuantitativos) y el punto de corte para catalogar una sobre-expresión han sido diversos. Por tanto sería necesario que se instaure un consenso respecto a las técnicas de detección de expresión de éstas oncoproteínas, los scores a utilizar y el punto de corte para catalogar una sobre-expresión.

De igual forma en la mayoría de estudios, las muestras han sido muy heterogéneas, en cuanto a tipo histológico, estadios tumorales, tratamientos administrados; haciendo difícil la realización de una comparativa.

Asimismo denotar que una buena parte de los estudios mencionados, no incluyeron el performance estatus o la metastasis ganglionar como variables clínicas a analizar; y por tanto se podría incurrir en sesgos al no realizar un análisis minucioso de los datos clínicos de interés.

Aun así hacen falta más estudios de tipo prospectivo, con muestras y tratamientos homogéneos que analicen el verdadero valor pronóstico de estas oncoproteínas, pero claro está sin olvidar un exhaustivo análisis de los datos clínicos, para poder objetivar resultados realmente concluyentes y que resuelvan las incertidumbres que dejan la disparidad de resultados que encontramos en la literatura científica.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. (2013). *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11* [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from <http://globocan.iarc.fr>.
2. Arbyn M, Castellsagué X, De Sanjosé S, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol*. 2011 Dec; 22 (12):2675-86.
3. Rodríguez-Rieiro C, Aragonés N, Pollán M y col. Evolución de la mortalidad por cáncer de cérvix por regiones en España entre 1975 y 2004. *Medicina Clínica*, Vol 133, Issue 2:41-46.
4. Kamangar F, Dores GM, and Anderson WF. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. *J Clin Oncol* 2006 May 10, Vol 24: 2137-2150.
5. Syrjänen K. New concepts on risk factors of HPV and novel screening strategies for cervical cancer precursors. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2008; 29(3):205-21.
6. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999. 189:12–19.
7. Muñoz N; Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology*. October 2000. Vol 19, Issue 1, 1-5.
8. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N. et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*.2003: 88, 63–73.
9. Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol*.1995. 69: 3074–3083.
10. Lowy DR, Howley PM. Fields virology. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Papillomaviruses*. Philadelphia, USA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001, 2231–64.
11. Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004; 109: 157–62.

12. Stephen C. Rubin, William J. Hoskins. Cervical cancer and preinvasive neoplasia. Lippincott-Raven. Publishers. Philadelphia. New York. 1996.
13. Gostout B, Podratz K, McGovern R, Persing D. Cervical cancer in older women: A molecular analysis of human papillomavirus types, HLA types, and p53 mutations. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179(1): 56-61.
14. Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, et al. Sexual behavior, venereal diseases, hygiene practices, and invasive cervical cancer in a high-risk population. *Cancer* 1990; 65(2): 380-386.
15. La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, et al. Sexual factors, venereal diseases, and the risk of intraepithelial and invasive cervical neoplasia. *Cancer* 1986; 58(4): 935-941.
16. Buckley JD, Harris RW, Dolí R, et al. Case-control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. *Lancet* 1981; 2(8254): 1010-1015.
17. Bosch FX, Castellsagué X, Muñoz N, et al. Male sexual behaviour and human Papillomavirus DNA: Key risk factor for cervical cancer in Spain. *J Nat Cancer Inst* 1996; 88:1.060-1.067.
18. Herrero R, Brinton LA, Hartge P et al. Determinants of the geographic variation of invasive cervical cancer in Costa Rica. *Bul Pan Am Health Organ* 1993; 27(1): 15-25.
19. Nawa A, Nishiyama Y, Kobayashi T, et al. Association of human leucocyte antigen-B VOS with cervical cancer in Japanese women aged 35 years and younger. *Cancer* 1995; 75(2): 518-521
20. Gregoire L, Lawrence WD, Kukuruga D, et al. Association between HLA.DQBI alleles and risk for cervical cancer in African- American women. *Int J Cancer* 1994; 57(4): 504-507.
21. Penn I. Cancers of the anogenital region in renal transplant patients: Analysis of 65 cases. *Cancer* 1986; 58: 611-616.
22. Ahdieh L, Klein RS ,Burk R, et al. Prevalence, incidence and type-specific persistence of HPV in HIV-positive and HIV-negative women. *J Infect Dis* 2001; 184: 682-690.
23. Barton SE, Maddox PH, Jenkins D, Edwards R, et al. Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change?. *Lancet* 1988; 2: 652.
24. Phillips AN, Smith GD. Cigarette smoking as a potential cause of cervical cancer: has cofounding been controlled? *MJ Epidemiol* 1994; 23: 42-49.
25. Hildesheim A, Brinton LA, Mallin K et al. Barrier and spermicidal contraceptive method and risk of invasive cervical cancer. *Epidemiology* 1990; 1(4): 266-272.

26. Delgado M, Sillero M, Martín JM, Gálvez R. Oral contraceptives and cancer of the cervix uteri. A meta-analysis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1992; 71: 368-295, 376.
27. Schlesselman JJ. Net effect of oral contraceptive use on the risk of cancer in women in the United States. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 793-801.
28. Anttila T, Saikku P, Koskela P, et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk of development of cervical squamous cell carcinoma. *J Am Med Assoc* 2001; 285:47-51.
29. Smith JS, Muñoz N, Herrero R, et al. Evidence for *Chlamydia Trachomatis* as a human papillomavirus cofactor in etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis* 2002; 185: 324-331.
30. Lehtinen M, Koskela P, Jellum E, et al. Herpes simplex virus and risk for cervical cancer: a longitudinal nested case-control study in the Nordic countries. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 687-692.
31. Sternberg SS. *Histology for Pathologist*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers; 1997.
32. Kurman RJ. *Blaustein's Pathology of the female genital tract*; 3rd ed., New York: Springer-Verlag; 2002.
33. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda system. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*; 2002. 287 (16): 2114-19.
34. Wright TC, Cox JT, Massad LS, et al. 2001 consensus guidelines for the management of woman with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287 (16): 2120-2129.
35. Negri G, Vittadello F, Romano F, et al. P16^{INK4a} expression and progression risk of low-grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri; *Virchows Archiv*.2004, Vol 445, Issue 6, pp 616-620
36. Ostör AG: Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: A critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186-92.
37. Ricart RM. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer* 1990; 75:131-132.
38. Jawovvski R, Pacay NF, Greenberg ML, Osborn RA. The histologic diagnosis of adenocarcinoma in situ and related lesions of the cervix uteri. *Cancer* 1988; 61: 1171-1181.
39. Connor JP, Miller DS, Bauer KO et al. Flow cytometric evaluation of early invasive cervical cancer. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 367-371.

40. Lnoe T, Okomura M. Prognostic significance of parametrial extension in patients with cervical carcinoma stages Ib, IIa and IIb: a study of 628 cases treated by radical hysterectomy and lymphadenectomy with or without postoperative irradiation. *Cancer* 1984; 4:1.714.
41. Chen NJ. Vagina invasion by cervical carcinoma. *Acta Med* 1993; 38: 305-313.
42. Creasman WT. New gynecologic cancer staging. *Gynecologic Oncology* 1995; 58: 157-158.
43. Brown JV, Fu YS, Berek JS. Ovarian metastases are rare in Stage I adenocarcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1990; 76: 623-626.
44. Tabata M, Ichinoe K, Sakuragi N, Shiina Y, et al. Incidence of ovarian metastasis in patients with cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1987; 28: 255-261.
45. Morris PC, Haugen J, Anderson B, Buller R. The significance of peritoneal cytology in stage IB cervical cancer. *Obstet Gynecol* 1992; 80:196-198.
46. Tellis CJ, Beechier CR. Pulmonary metastasis of carcinoma of the cervix: a retrospective study. *Cancer* 1982; 49: 1705-1 709.
47. Lacey JV Jr., Brinton LA, Abbas FM, et al. Oral contraceptives as risk factors for cervical adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8:1079-1085.
48. Benjamin E. Greer, Wui-Jin Koh, Nadeem R. Abu-Rustum, et al.; Cervical Cancer: Clinical Practice Guidelines in Oncology 2010; 8:1388-1416 *J Natl Compr Canc Netw*.
49. Jhingran A, Russell AH, Seiden MV et al. Cancers of the cervix, vulva, and vagina. *Abeloff's Clinical Oncology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill-Livingstone; 2008: chap 91.
50. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin*. 2012 May-Jun; 62 (3):147-72.
51. USPSTF (U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement). Screening for Cervical Cancer. 2012.
52. ACOG Practice Bulletin No. 131: Screening for Cervical Cancer. ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology. *Obstet Gynecol*. 2012 Nov; 120(5):1222-38.
53. ACOG Practice Bulletin. Diagnosis and treatment of cervical carcinomas. Number 35, May 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 78: 79-91.

54. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet* 2009; 105:103– 104.
55. Park JY, Kim EN, Kim DY, et al. Comparison of the validity of magnetic resonance imaging and positron emission tomography/ computed tomography in the preoperative evaluation of patients with uterine corpus cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 108:486–492.
56. Perez CA, Kavanagh BD. Uterine cervix. In: Perez CA, Brady LW, Halperin EC, et al., eds. *Principles and practice of radiation oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004; 1800-1915.
57. Heller PB, Malfetano JH, Bundy BN, et al. Clinical-pathologic study of stage IIB, III, and IVA carcinoma of the cervix: extended diagnostic evaluation for paraaortic node metastasis. A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 425-430.
58. Hricak H, Powell B, Yu KK, et al. Invasive cervical carcinoma: role of MR imaging in pretreatment work-up: cost minimization and diagnostic efficacy analysis. *Radiology* 1996; 198:403-409.
59. Wong TZ, Jones EL, Coleman RE. Positron emission tomography with 2-deoxy- 2- [(18) F] fluoro-D-glucose for evaluating local and distant disease in patients with cervical cancer. *Mol Imaging Biol* 2004; 6: 55–62.
60. Loft A, Berthelsen AK, Roed H, et al. The diagnostic value of PET/CT scanning in patients with cervical cancer: a prospective study. *Gynecol Oncol* 2007; 106: 29–34.
61. Haie-Meder C, Mazon R, Magné N. Review. Clinical evidence on PET–CT for radiation therapy planning in cervix and endometrial cancers. *Radiotherapy and Oncology*. 2010 Sep; 96 (3):351-5.
62. Balleyguier C, Sala E, Da Cunha T, et al. Staging of uterine cervical cancer with MRI: guidelines of the European Society of Urogenital Radiology. *Eur Radiol*. 2011 May; 21(5):1102-10.
63. Hricak H, Hu KK. Radiology in invasive cervical cancer. *AJR Am Roentgenol* 1996; 167: 1101.
64. Scheidler J, Hricak H, Yu KK, Subak L, Segal MR. Radiological evaluation of lymph node metastases in patients with cervical cancer. A meta-analysis. *JAMA* 1997; 278:1096–101.
65. Stehman FB, Bundy BN, DiSaia PJ, et al: Carcinoma of the cervix treated with irradiation therapy: I. A multivariate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer*. 1991, 67:2776-2785.

66. Brockbank E, Kokka F, Bryant A, Pomel C, Reynolds K. Review: Pre-treatment surgical para-aortic lymph node assessment in locally advanced cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Mar 28; 3
67. Lai CH, Huang KG, Hong JH, Lee CL, Chou HH, Chang TC, et al. Randomized trial of surgical staging (extraperitoneal or laparoscopic) versus clinical staging in locally advanced cervical cancer. *Gynecological Oncology* 2003; 89: 160–7
68. Rose PG, Adler LP, Rodríguez M, et al. Positron emission tomography for evaluating para-aortic nodal metastasis in locally advanced cervical cancer before surgical staging: A surgicopathologic study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 41-45.
69. Narayan K, Hicks RJ, Jobling T, et al. A comparison of MRI and PET scanning in surgically staged loco-regionally advanced cervical cancer: Potential impact on treatment. *Int J of Gynecol Cancer*. July/August 2001. Vol 11, Issue 4, pag 263–271.
70. Sugawara Y, Eisbruch A, Kosuda S, et al. Evaluation of FDG PET in patients with cervical cancer. *J Nucl Med* 1999; 40: 1125–31
71. Havrilesky LJ, Kulasingam SL, Matchar DB, et al. FDG-PET for management of cervical and ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 97; 183-191, 2005.
72. Choi HJ, Roh JW, Seo SS, et al. Comparison of the accuracy of magnetic resonance imaging and positron emission tomography/ computed tomography in the presurgical detection of lymph node metastases in patients with uterine cervical carcinoma: A prospective study. *Cancer* 106:914-922, 2006.
73. United States Department of Health and Humana Services: Centers for Medicare and Medicaid Services: Decision Memo for Positron Emission Tomography (FDG) for Brain, Cervical, Ovarian, Pancreatic, Small Cell Lung and Testicular Cancers (CAG-00181). [http:// www.cms.hhs.gov/mcd/viewdecisionmemo.asp](http://www.cms.hhs.gov/mcd/viewdecisionmemo.asp)
74. Tattersall MH, Larvidhaya V, Vootiprux V, et al. Randomized trial of epirubicin and cisplatin chemotherapy followed by pelvic radiation in locally advanced cervical cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 444-51.
75. Chauvergne J, Rohart J, Heron JF, et al. Randomized trial of initial chemotherapy in 151 locally advanced carcinoma of the cervix (T2b-N1, T3b, M0). *Bull Cancer* 1990; 77 (10): 1007-24.
76. Sundorf K, Trope CG, Hogberg T, et al. Radiotherapy and neoadjuvant chemotherapy for cervical carcinoma. A randomized multicenter study of sequential cisplatin and 5-fluorouracil and radiotherapy in advanced cervical carcinoma stage IIIB and IVA. *Cancer* 1996; 77 (11): 2371-78.
77. Chiara S, Bruzzone M, Merlini L, et al. Randomized study comparing chemotherapy plus radiotherapy versus radiotherapy alone in FIGO stage IIB-III cervical carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1994; 17(4): 294-97.

78. Kumar L, Kaushal R, Nandy M, et al. Chemotherapy followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in locally advanced cervical cancer: a randomized study. *Gynecol Oncol* 1994; 54 (3): 307-15.
79. Potish RA and Twigg LB. On the lack of demonstrated clinical benefit of neoadjuvant cisplatin therapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27: 975-79.
80. Whitney CW, Sause W, Bundy BN, et al.: Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 17 (5): 1339-48, 1999.
81. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al.: Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 340 (15): 1137-43, 1999.
82. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, et al.: Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 340 (15): 1144-53, 1999.
83. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, et al.: Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 340 (15): 1154-61, 1999.
84. Peters WA III, Liu PY, Barrett RJ Jr., et al.: Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 18 (8): 1606-13, 2000.
85. Pearcey R, Brundage M, Drouin P, et al: Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 20:966-972, 2002
86. Monk BJ, Wang J, Im S, et al. Rethinking the use of radiation and chemotherapy after radical hysterectomy: A clinical pathology analysis of a Gynecologic Oncology Group/ Southwest Oncology Group/ Radiation Therapy Oncology Trial. *Gynecol Oncol* 96:721- 728, 2005.
87. Yessaian A, Magistris A, Burger RA, et al: Radical hysterectomy followed by tailored postoperative therapy in the treatment of stage IB2 cervical cancer: Feasibility and indications for adjuvant therapy. *Gynecol Oncol* 94: 61-66, 2004.
88. Goff BA, Muntz HG, Paley PJ, et al. Impact of surgical staging in women with locally advanced cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 436–442.

89. Gold MA, Tian C, Whitney CW, et al.: Surgical versus radiographic determination of para-aortic lymph node metastases before chemoradiation for locally advanced cervical carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 112 (9): 1954-63, 2008.
90. National Cancer Institute-USA. Guidelines for clinical practice. Cervical cancer treatment (PDQ®). 2014.
91. Vigliotti AP, Wen BC, Hussey DH, et al.: Extended field irradiation for carcinoma of the uterine cervix with positive periaortic nodes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 23 (3): 501-9, 1992.
92. Varia MA, Bundy BN, Deppe G, et al. Cervical carcinoma metastatic to para-aortic nodes: extended field radiation therapy with concomitant 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998; 42: 1015–1023.
93. Rotman M, Pajak TF, Choi K, et al.: Prophylactic extended-field irradiation of para-aortic lymph nodes in stages IIB and bulky IB and IIA cervical carcinomas. Ten-year treatment results of RTOG 79-20. *JAMA* 274 (5): 387-93, 1995.
94. Malfetano JH, Keys H, Cunningham MJ, et al. Extended Field Radiation and Cisplatin for Stage IIB and IIIB Cervical Carcinoma. *Gynecol Oncol* 67, 203–207, 1997.
95. Eifel PJ, Winter K, Morris M, et al. Pelvic irradiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic irradiation for high-risk cervical cancer: an update of radiation therapy oncology group trial (RTOG) 90-01. *J Clin Oncol* 2004; 22:872-80.
96. Grigsby PW, Heydon K, Mutch DG, et al. Long-term follow-up of RTOG 92-10: cervical cancer with positive para-aortic lymph nodes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51:982-7.
97. Kim YS, Kim JH, Ahn SD, et al. High-dose extended-field irradiation and high-dose-rate brachytherapy with concurrent chemotherapy for cervical cancer with positive para-aortic lymph nodes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74:1522-8.
98. Stock RG, Chen AS, Flickinger JC, et al: Node-positive cervical cancer: impact of pelvic irradiation and patterns of failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:(1) 31–6, 1995
99. Chatani M, Matayoshi Y, Masaki N, et al: Prophylactic irradiation of paraaortic lymph nodes in carcinoma of the uterine cervix. A prospective randomized study. *Strahlentherapie Oncol* 171:(11) 655–60, 1995.
100. Jolles CJ, Freedman RS, Hamberger AD, et al: Complications of extended-field therapy for cervical carcinoma without prior surgery. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12:179 –183, 1985

101. Small W Jr., Winter K, Levenback C, et al. Extended-field irradiation and intracavitary brachytherapy combined with cisplatin chemotherapy for cervical cancer with positive para-aortic or high common iliac lymph nodes: Results of arm 1 of RTOG 0116. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 68:1081–1087.
102. Lanciano RM, Pajack TF, Martz K, et al. The influence of treatment time on outcome for squamous cell cancer of the uterine cervix treated with radiation: a patterns-of-care study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25:391-97.
103. Pérez CA, Grigsby P, Castro-Vita H, et al. Carcinoma of the uterine cervix. Impact on prolongation of overall treatment time and timing of brachytherapy on outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32 (5): 1275-88.
104. Preterit DG, Sarkaria JN, Chappell R, et al. The adverse effect of treatment prolongation in cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32 (5): 1301-07.
105. Song S, Rudra S, Hasselle MD, et al. The effect of treatment time in locally advanced cervical cancer in the era of concurrent chemoradiotherapy. *Cancer* 2013 Jan 15; 119 (2):325-31.
106. Portelance L, Chao KS, Grigsby PW, et al. Intensity-modulated radiation therapy (IMRT) reduces small bowel, rectum, and bladder doses in patients with cervical cancer receiving pelvic and para-aortic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:261-2.
107. Ahmed RS, Kim RY, Duan J, et al. IMRT escalation for positive para-aortic lymph node in patients with locally advanced cervical cancer while reducing dose to bone marrow and other organs at risk. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60:505–12.
108. Gerszten K, Colonello K, Heron DE, et al. Feasibility of concurrent cisplatin and extended field radiation therapy (EFRT) using intensity-modulated radiotherapy (IMRT) for carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2006; 102:182-8.
109. Beriwal S, Gan GN, Heron DE, et al. Early clinical outcome with concurrent chemotherapy and extended-field, intensity-modulated radiotherapy for cervical cancer *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 May 1; 68(1):166-71.
110. Jensen LG, Hasselle MD, Rose BS, et al. Outcomes for patients with cervical cancer treated with extended-field intensity-modulated radiation therapy and concurrent cisplatin. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Jan; 23(1):119-25.
111. Zhang G, He F, Fu C, et al. Definitive extended field intensity-modulated radiotherapy and concurrent cisplatin chemosensitization in the treatment of IB2-IIIB cervical cancer. *J Gynecol Oncol*. 2014 Jan; 25(1):14-21.
112. Liang JA, Chen SW, Hung YC, et al. Low-dose, prophylactic, extended field, intensity-modulated radiotherapy plus concurrent weekly cisplatin for patients with stage IB2-IIIB cervical cancer, positive pelvic lymph nodes, and negative para-aortic lymph nodes. *Int J Gynecol Cancer*. 2014 Jun; 24(5):901-7.

113. Pötter R, Haie-Meder C, Van Limbergen E, et al. Recommendations from gynecological (GYN) GEC ESTRO working group (II): concepts and terms in 3D image based treatment planning in cervix cancer brachytherapy 3D dose volume parameters and aspects of 3D image based anatomy, radiation physics, radiobiology. *Radiother Oncol* 2006; 78:67-77.
114. Viswanathan AN, Erickson BA. Three dimensional imaging in gynecologic brachytherapy: a survey of the American Brachytherapy Society. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76: 104-109.
115. Haie-Meder C, Potter R, Van Limbergen E, et al. Recommendations from Gynecological (GYN) GEC ESTRO Working Group (I): concepts and terms in 3D image-based 3D treatment planning in cervix cancer brachytherapy with emphasis on MRI assessment of GTV and CTV. *Radiother Oncol* 2005; 74:235–45.
116. Potter R, Van Limbergen E, Wambersie A. Reporting in brachytherapy: dose and volume specification. In: Gerbaulet A, Potter R, Mazeron JJ, Meertens H, editors. *The GEC ESTRO handbook of brachytherapy*. Brussels: ESTRO; 2002. p. 155–215.
117. Potter R, Kirisits C, Fidaro EF, et al. Present status and future of high-precision image guided adaptive brachytherapy for cervix carcinoma. *Acta Oncol.*, 2008; 47: 1325-1336
118. Vale C, Thierny JF, Stewart LA. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol* 2008; 26:5802–12.
119. Michiels S, Le Maitre A, Buyse M, et al. Surrogate endpoints for overall survival in locally advanced head and neck cancer: meta-analyses of individual patient data. *Lancet Oncol* 2009; 10:341–50.
120. Meta-Analysis Group, Medical Research Council Clinical Trials Unit, London, United Kingdom. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: individual patient data meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jan 20;(1)
121. Dueñas- González A, Zarba JJ, Patel F, et al. Phase III, Open-Label, Randomized Study Comparing Concurrent Gemcitabine Plus Cisplatin and Radiation Followed by Adjuvant Gemcitabine and Cisplatin Versus Concurrent Cisplatin and Radiation in Patients With Stage IIB to IVA Carcinoma of the Cervix. *J Clin Onc* 2011; 29:1678–85
122. Markman M. Chemoradiation in the management of cervix cancer: current status and future directions. *Oncology*. 2013; 84(4):246-50.
123. Potter R, Dimopoulos J, Georg P, et al. Clinical impact of MRI assisted dose volume adaptation and dose escalation in brachytherapy of locally advanced cervix cancer. *Radiotherapy and Oncology* 83 (2007) 148–155

124. Chargari C, Magne N, Dumas I, et al. Physics Contributions and Clinical Outcome with 3D-MRI-Based Pulsed-Dose-Rate Intracavitary Brachytherapy in Cervical Cancer Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74:133–39.
125. Mahantshetty U, Banerjee S, Chopra S, Engineer R, Shrivastava SK. Clinical outcome of patients treated with template based high dose rate (HDR) interstitial brachytherapy boost in gynecological malignancies. *Radiother Oncol* 2011; 99:S117.
126. Pötter R, Georg P, Dimopoulos J, Clinical outcome of protocol based image (MRI) guided adaptive brachytherapy combined with 3D conformal radiotherapy with or without chemotherapy in patients with locally advanced cervical cancer. *Radiother Oncol*. 2011 Jul; 100(1):116-23.
127. Paavonen, J et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 2161-2170
128. A Study of VGX-3100 DNA Vaccine With Electroporation in Patients With Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 2/3 or 3 (HPV-003); [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01304524](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01304524). Pending publishing.
129. Wheeler CM, Castellsagué X, Garland SM, Szarewski A, et al.; HPV PATRICIA Study Group. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol*. 2012 Jan; 13(1):100-10.
130. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations on the use of quadrivalent human papillomavirus vaccine in males-Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2011.MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2011; 60(50):1705–1708.
131. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). FDA licensure of bivalent human papillomavirus vaccine (HPV2, Cervarix) for use in females and updated HPV vaccination recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP).MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2010; 59 (20):626–629.
132. Delaloye JF, Pampallona S, Coucke PA, et al. Younger age as a bad prognostic factor in patients with carcinoma of the cervix. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 64:201-205.
133. Monk B J, Tian Ch, Rose P G, et al. Which clinical/pathologic factors matter in the era of chemoradiation as treatment for locally advanced cervical carcinoma? Analysis of two Gynecologic Oncology Group (GOG) trials *Gynecologic Oncology* 105 (2007) 427–433

134. Sorbe B, Bohr L, Karlsson L et al. Combined external and intracavitary irradiation in treatment of advanced cervical carcinomas: Predictive factors for local tumor control and early recurrences. *Int J Oncol* 36: 371-378, 2010.
135. Rutledge FN, Mitchell MF, Nunsell S, et al. Youth as a prognostic factor in carcinoma of the cervix: a matched analysis. *Gynecol Oncol* 1992; 44:123-130.
136. Mitchell PA, Waggoner S, Rotmensch J, et al. Cervical cancer in the elderly treated with radiation therapy. *Gynecol Oncol* 1998; 71:291-298.
137. Kodama S, Kanazawa K, Honma S and Tanaka K. Age as a prognostic factor in patients with cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1992; 68 (11): 2481-85.
138. Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Med Oncol* 2001; 18:243-259.
139. Harrison LB, Chadha M, Hill RJ et al. Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. *The Oncologist* 2002; 7:492-508.
140. Hall EJ. Radiobiology for the Radiologist. Philadelphia, PA: Lippincott, 1994.
141. Molls M, Stadler P, Becker A et al. Relevance of oxygen in radiation oncology. Mechanisms of action, correlation to low hemoglobin levels. *Strahlenther Onkol* 1998; 174 (suppl 4):13-16.
142. Kumar P. Impact of anemia in patients with head and neck cancer. *The Oncologist* 2000; 5(suppl 2):13-18.
143. Hockel M, Vorndran B, Schlenger K et al. Tumor oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1993; 51:141-149.
144. Fyles AW, Milosevic M, Wong R et al. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radiother Oncol* 1998; 48:149-156.
145. Sundfor K, Lyng H, Rofstad EK. Tumour hypoxia and vascular density as predictors of metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Br J Cancer* 1998; 78:822-827.
146. Knocke TH, Weitmann HD, Feldmann HJ et al. Intratumoral pO₂-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. *Radiother Oncol* 1999; 53:99-104.
147. Sundfor K, Lyng H, Trope CG et al. Treatment outcome in advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix: relationships to pretreatment tumor oxygenation and vascularization. *Radiother Oncol* 2000; 54:101-107.

- 148 Hockel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:266-276.
149. Degner FL, Sutherland RM. Mathematical modelling of oxygen supply and oxygenation in tumor tissues: prognostic, therapeutic, and experimental implications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 15:391-397.
150. Vaupel P, Thews O, Mayer A et al. Oxygenation status of gynecologic tumors: what is the optimal hemoglobin level? *Strahlenther Onkol* 2002; 178:727-731.
151. Seidenfeld J, Piper M, Flamm C, et al. Epoetin treatment of anemia associated with cancer therapy: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1204-1214.
152. Kavanagh BD, Fischer BA, Segreti EM, et al. A cost analysis of erythropoietin versus blood transfusions for cervix cancer patients receiving chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51:435-441.
153. Álvarez RD, Soong SJ, Kinney WK, et al. Identification of prognostic factors and risk groups in patients found to have nodal metastasis at the time of radical hysterectomy for early stage squamous carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1989; 35:130-135.
154. Delgado G, Bundy BN, Fowler WC, et al. A prospective surgical pathological study of stage I squamous carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1989; 35:314-320.
155. Sorbe B, Bohr L, Karlsson L et al. Combined external and intracavitary irradiation in treatment of advanced cervical carcinomas: Predictive factors for local tumor control and early recurrences. *Int J of Oncol* 36: 371-378, 2010
156. Eifel PJ, Morris M, Wharton JT, et al. The influence of tumor size and morphology on the outcome of patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 9-16.
157. Monk BJ, Wang J, Im S, et al. Rethinking the use of radiation and chemotherapy after radical hysterectomy: A clinical pathology analysis of a Gynecologic Oncology Group/ Southwest Oncology Group/ Radiation Therapy Oncology Trial. *Gynecol Oncol* 96:721- 728, 2005.
158. Yessaian A, Magistris A, Burger RA, et al: Radical hysterectomy followed by tailored postoperative therapy in the treatment of stage IB2 cervical cancer: Feasibility and indications for adjuvant therapy. *Gynecol Oncol* 94: 61-66, 2004.
159. Stehman FB, Bundy BN, Di Saia PJ, et al. Carcinoma of the cervix treated with radiation therapy. A multivariate analysis of prognostic variables in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 1991; 67:2776–85.

160. DiSaia PJ, Creasman WT, editors. Invasive Cervical Cancer. Clinical Gynecologic Oncology, 6 ed.; 2002. p. 35–112.
161. Singh N, Arif S. Histopathologic parameters of prognosis in cervical Cancer—a review. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(5):741–50.
162. Hong JH, Tsai CS, Lai CH, et al. Risk stratification of patients with advanced squamous cell carcinoma of cervix treated by radiotherapy alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63:492–499.
163. Ohara K, Tanaka YO, Tsunoda H, et al. Nonoperative assessment of nodal status for locally advanced cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy with regard to patterns of treatment failure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 55: 354–361.
164. Liang JA, Chen SW, Chang WC, et al. Risk stratification for failure in patients with advanced cervical cancer after concurrent chemoradiotherapy: Another way to optimise treatment results. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2008; 20:683–690.
165. Álvarez RD, Soong SJ, Kinney WK, et al. Identification of prognostic factors and risk groups in patients found to have nodal metastasis at the time of radical hysterectomy for early stage squamous carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1989; 35:130-135.
166. Delgado G, Bundy B, Zaino R, et al. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 352.
167. Van Nagell Jr., Donaldson ES, Wood EG, Parker JC Jr. The significance of vascular invasion and lymphocytic infiltration in invasive cervical cancer. *Cancer*. 1978; 41:228–234.
168. Murakami I, Fujii T, Kameyama K, et al. Tumor volume and lymphovascular space invasion as a prognostic factor in early invasive adenocarcinoma of the cervix. *J Gynecol Oncol*. 2012 Jul; 23(3): 153–158.
169. Morice P, Piovesan P, Rey A, D. et al. Prognostic value of lymphovascular space invasion determined with hematoxylin–eosin staining in early stage cervical carcinoma: results of a multivariate analysis. *Annals of Oncology* 2003, 14 (10); 1511-1517.
170. Benda JA. Histopathologic prognostic factors in early stage cervical carcinoma. *Mongr Natl Cancer Inst* 1996; 21; 27-34.
171. Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A, et al. Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell carcinoma of the cervix? *Cancer* 1995; 76:1948–55.

172. Alfsen GC, Kristensen GB, Skovlund E, et al. Histologic subtype has minor importance for overall survival in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: a population-based study of prognostic factors in 505 patients with non squamous cell carcinomas of the cervix. *Cancer* 2001; 92:2471–83.
173. Lee KBM, Lee JM, Park CY, et al. What is the difference between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix? A matched case– control study. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:1569–73
174. Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, et al. Prognosis and clinicopathological characteristics of Ib-IIb adenocarcinoma of the uterine cervix in patients who have had radical hysterectomy. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26:464–7.
175. Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, et al. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81:1144–51.
176. Davy MLJ, Dodd TJ, Luke CJ, et al. Cervical cancer: effect of glandular cell type on prognosis, treatment, and survival. *Obstet Gynecol* 2003; 101:38–45.
177. Hopkins MP, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1991; 77:912–7.
178. Lai CH, Hsueh S, Hong JH, et al. Are adenocarcinomas and adenosquamous carcinomas different from squamous carcinomas in stage IB and II cervical cancer patients undergoing primary radical surgery? *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9:28–36.
179. Ngan HY, Chan SY, Wong LC, et al. Serum squamous cell carcinoma antigen in the monitoring of radiotherapy treatment response in carcinoma of the cervix *Gynecol Oncol* 1990; 37:260–3.
180. Ohno T, Nakayama Y, Nakamoto S, et al. Measurement of serum squamous cell carcinoma antigen levels as a predictor of radiation response in patients with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 2003; 97:3114–3120.
181. Chan YM, Ng TY, Ngan HYS, et al. Monitoring of serum squamous cell antigen levels in invasive cervical cancer: Is it cost effective? *Gynecol Oncol* 2002; 84:7–11.
182. Forni F., Ferrandina G, Deodato F, et al. Squamous cell carcinoma antigen in follow-up of cervical cancer treated with radiotherapy: evaluation of cost-effectiveness. *Int. J. Rad Oncol Biol. Phys.*, Vol. 69, (4), 2007, 1145–1149.
183. Van Nagell JR Jr., Donaldson ES, Gay EC, et al. Carcinoembryonic antigen in carcinoma of the uterine cervix. 1. The prognostic value of serial plasma determinations. *Cancer* 1978; 42: 2428–2434.

184. Kjorstad KE, Orjaseter H. Carcinoembryonic antigen levels in patients with squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1978; 51:536–540.
185. Yoon SM, Shin KH, Kim JY, et al. The clinical values of squamous cell carcinoma antigen and carcinoembryonic antigen in patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17:872–878.
186. Chen SW, Liang JA, Hung YC, et al. Clinical implications of elevated pretreatment carcinoembryonic antigen in patients with advanced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Tumour Biol* 2008; 29:255–261.
187. Huang E Y, Hsu H Ch, Sun, et al. Prognostic value of pretreatment carcinoembryonic antigen after definitive radiotherapy with or without concurrent chemotherapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 81, No. 4, pp. 1105–1113, 2011
188. Chung EJ, Seong J, Yang WI, et al. Spontaneous apoptosis as a predictor of radiotherapy in patients with stage IIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Oncol* 1999; 38:449-454.
189. Sheridan MT, Cooper RA, West CM. A high ratio of apoptosis to proliferation correlated with improved survival after radiotherapy for cervical adenocarcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 44:507-512.
190. Ebara T, Mitsuhashi N, Saito Y, et al. Prognostic significance of immunohistochemically detected p53 protein expression in stage IIIB squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation therapy alone. *Gynecol Oncol* 1996; 63:216-218.
191. Oka K, Suzuki Y, Nakano T. Expression of p27 and p53 in cervical squamous cell carcinoma patients treated with radiotherapy alone: radiotherapeutic effect and prognosis. *Cancer* 2000; 88:2766-2773.
192. Grace VM, Shalini JV, Iekha TT, et al. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynaecol Oncol* 2003; 91:51-58
193. Wootipoom V, Lekhyananda N, Phungrassami T, et al. Prognostic significance of Bax, Bcl-2, and p53 expressions in cervical squamous cell carcinoma treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2004; 94:636-642.
194. Iwasaka T, Yokoyama M, Oh-Uehida M, et al. Detection of human papillomavirus genome and analysis of expression of c-myc and Ha-ras oncogenes in invasive cervical cancers. *Gynecol Oncol* 1992; 46:298-303

195. Hockel M, Schlenger K, Mitze M, et al. Tumor vascularity, a novel prognostic factor in advanced cancer of the uterine cervix. *Proc Soc Gynecol Oncol* 1995; 48
196. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 353.
197. Loncaster JA, Cooper RA, Logue JP, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix. *Br J Cancer* 2000; 83:620-625.
198. Sporn, M.B., Roberts, A.B., 1985. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313, 745–747.
199. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, et al. Review. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366 (2006) 2–16.
200. Baselga, J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy. *Oncologist*. 2002; 7 Suppl 4:2-8.
201. Citri A., & Yarden Y. EGF-ERBB signalling: Towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul; 7(7):505-16.
202. Mendelsohn, J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2001 Mar; 8(1):3-9.
203. Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacology & Therapeutics* 102 (2004) 37–46.
204. Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, et al. Review. The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: From expression to turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1766 (2006) 120–139.
205. Athale CA, Deisboeck TS, The effects of EGF-receptor density on multiscale tumor growth patterns, *J. Theor. Biol.* 238 (2006) 771–779.
206. El-Obeid A, Hesselager G, Westermarck B, M, et al. TGF- α -driven tumor growth is inhibited by an EGF receptor tyrosine kinase inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 349–358.
207. Bianco R, Gelardi T, Damiano V, et al. Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *IJBCB* 39 (2007) 1416–1431.
208. Buettner R, Mora LB, & Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002. 8(4), 945–954.

209. Zanke B. Growth factors and intracellular signalling. In: Tannock IF, Hill RP, editors. *The basic science of oncology*. New York: Mc Graw-Hill; 1998.
210. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Xiao FY, et al. Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 1999; 5:4164–74.
211. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62:7350–6.
212. Ma BB, Poon TC, To KF, Zee B, et al. Prognostic significance of tumor angiogenesis, Ki 67, p53 oncoprotein, epidermal growth factor receptor and HER2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma—a prospective study. *Head Neck* 2003; 25:864–72.
213. Eriksen JG, Steiniche T, Overgaard J. The role of epidermal growth factor receptor and E-cadherin for the outcome of reduction in the overall treatment time of radiotherapy of supraglottic larynx squamous cell carcinoma. *Acta Oncol* 2005;44:50-8.
214. Bentzen SM, Atasoy BM, Daley FM, et al. Epidermal growth factor receptor expression in pretreatment biopsies from head and neck squamous cell carcinoma as a predictive factor for a benefit from accelerated radiation therapy in a randomized controlled trial. *J Clin Oncol* 2005; 23:5560–7.
215. Eriksen JG, Steiniche T, Overgaard J. The influence of epidermal growth factor receptor and tumor differentiation on the response to accelerated radiotherapy of squamous cell carcinomas of the head and neck in the randomized DAHANCA 6 and 7 study. *Radiother Oncol* 2005; 74: 93–100.
216. Smid EJ, Stoter TR, Bloemena E, et al. The importance of immunohistochemical expression of EGFr in squamous cell carcinoma of the oral cavity treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65:1323–9.
217. Akimoto T, Hunter NR, Buchmiller L, Mason K, Ang KK, Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2884–90.
218. Milas L, Fan Z, Andratschke NH, Ang KK. Epidermal growth factor receptor and tumor response to radiation: in vivo preclinical studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58:966–71.
219. Bowers G, Reardon D, Hewitt T, Dent P, et al. The relative role of ErbB1–4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human carcinoma cells. *Oncogene* 2001; 20:1388–97.
220. Dittmann K, Mayer C, Fehrenbacher B, Schaller M, Raju U, Milas L, et al. Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2005; 280:31182–9.

221. Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, et al. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000 Aug 1; 48(1):7-16.
222. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G, Distefano M, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74:1253–7.
223. Fischer-Colbrie J, Witt A, Heinzl H, et al. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res* 1997, 17, 613–620.
224. Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 1999, 5, 577–586.
225. Mellon K, Wright C, Kelly P, et al. Long-term outcome related to epidermal growth factor receptor status in bladder cancer. *J Urol* 1995, 153, 919–925.
226. Inada S, Koto T, Futami K, Arima S, et al. Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E cadherin, epidermal growth factor receptor). *Surg Today* 1999, 29, 493–50.
227. Hirai T, Kuwahara M, Yoshida K, et al. Clinical results of transhiatal esophagectomy for carcinoma of the lower thoracic esophagus according to biological markers. *Dis Esophagus* 1998, 11, 221–225.
228. Salomon DS, Bradt R, Ciardello F and Normanno N. Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Rev Oncol/Hematol* 1995; 19: 183-232.
229. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* 37 (2001) S9–S15
230. Yonemura Y, Takamura H, Ninomiya I, et al. Interrelationship between transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in advanced gastric cancer. *Oncology* 1992, 49, 157–161.
231. Klijn JG, Berns PM, Schmitz PL, Fockens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* 1992, 13, 3–17.
232. Niikura H, Sasano H, Matsunaga G, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in endometrioid endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 1995, 26, 892–896.

233. De Jong KP, Stellema R, Karrenbeld A, et al. Clinical relevance of transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, p53, and Ki67 in colorectal liver metastases and corresponding primary tumors. *Hepatology* 1998, 28, 971–979.
234. Tsugawa K, Yonemura Y, Hirono Y, et al. Amplification of the c-met, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features. *Oncology* 1998, 55, 475–481.
235. Yasui W, Hata J, Yokozaki H, et al. Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1988, 41, 211–217.
236. Yasui W, Sumiyoshi H, Hata J, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in human gastric and colonic carcinomas. *Cancer Res* 1988, 48, 137–141.
237. Prakash I, Mathur RP, Kar P, et al. Comparative evaluation of cell proliferative indices and epidermal growth factor receptor expression in gastric carcinomas. *Indian J Pathol Microbiol* 1997, 40, 481–490.
238. Tokunaga A, Onda M, Okuda T, et al. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer* 1995, 75, 1418–1425.
239. Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, et al. Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, oestrogen receptor-positive breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* (2001) 8, 175–182.
240. Kluftinger AM, Robinson BW, Quenville NF, et al. Correlation of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 oncogene product to known prognostic indicators of colorectal cancer. *Surg Oncol* 1992, 1, 97–105.
241. Steele RJ, Kelly P, Ellul B, Eremin O. Epidermal growth factor receptor expression in colorectal cancer. *Br J Surg* 1990, 77, 1352–1354.
242. Mayer A, Takimoto M, Fritz E, Schellander G, et al. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor and mdx gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1993, 71, 2454–2460.
243. Osborne CK and Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med*. 2011; 62: 233–247.
244. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839, an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2053–63.
245. Baselga J, Trigo JM, Bournis J, et al. Phase II multicenter study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic

and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2005; 23:5568-77.

246. Pirker R, Pereira JR, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*. 2012 Jan; 13(1):33-42.

247. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23(9): 1803-10.

248. Mendelsohn J and Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2002; 14: 2787-99.

249. Hebbar M, Wacrenier A, Desauw C, et al. Lack of usefulness of epidermal growth factor receptor expression determination for cetuximab therapy in patients with colorectal cancer. *Anticancer Drugs*. 2006 Aug; 17(7):855-7.

250. Chapman WB, Lorincz AT, Willett GD et al. Epidermal growth factor receptor expression and the presence of human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Pathol* 1992; 11: 221–226.

251. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 244–265.

252. Zhang B, Srirangam A, Potter DA, Roman A. HPV16 E5 protein disrupts the c-Cbl-EGFR interaction and EGFR ubiquitination in human foreskin keratinocytes. *Oncogene* 2005; 24: 2585–2588.

253. Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, et al. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the down regulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol* 1993; 67: 4521–4532.

254. Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol* 2003; 148: 1445–1453.

255. Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. *Cancer Res* 2001; 61: 3837–3843.

256. Sizemore N, Choo CK, Eckert RL, Rorke EA. Transcriptional regulation of the EGF receptor promoter by HPV16 and retinoic acid in human ectocervical epithelial cells. *Exp Cell Res* 1998; 244: 349–356.

257. Hu G, Liu W, Mendelsohn J et al. Expression of epidermal growth factor receptor and human papillomavirus E6/E7 proteins in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1271–1276.

258. Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004; 109: 157–62.
259. Arias-Pulido H, Joste N, Chavez A et al. Absence of epidermal growth factor receptor mutations in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18:749–754.
260. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Martinho O et al. Molecular characterization of EGFR, PDGFRA and VEGFR2 in cervical adenosquamous carcinoma. *BMC Cancer* 2009; 9: 212.
261. Reiner A, Spona J, Reiner G et al. Estrogen receptor analysis on biopsies and fine-needle aspirates from human breast carcinoma. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Am J Pathol* 1986; 125: 443– 449.
262. Remmele W, Schickelanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract* 1993; 189: 862–866.
263. Hale RJ, Buckley CH, Gullick WJ et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46: 149–153.
264. Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, Trope CG. Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer* 1996; 78: 433–440.
265. Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 1999; 5, 577–586.
266. Cho NH, Kim YB, Park TK et al. P63 and EGFR as prognostic predictors in stage IIB radiation-treated cervical squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol* 2003; 91: 346–353.
267. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 922–928.
268. Kim GE, Kim YB, Cho NH et al. Synchronous coexpression of epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in carcinomas of the uterine cervix: a potential predictor of poor survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1366–1374.
269. Pérez-Regadera J, Sanchez-Muñoz A, De-la-Cruz J et al. Negative prognostic impact of the coexpression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in locally advanced cervical cancer. *Oncology* 2009; 76:133–141.

270. Noordhuis MG, Eijssink JJ, Ten Hoor KA et al. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and activated EGFR predict poor response to (chemo) radiation and survival in cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7389–7397.
271. Hayashi Y, Hachisuga T, Iwasaka T et al. Expression of ras oncogene product and EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. *Gynecol Oncol* 1991; 40: 147–151.
272. Oka K, Nakano T and Arai T. Expression of cathepsin D and epidermal growth factor in stage III cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*, 1997; 7: 122–126.
273. Chang JL, Tsao YP, Liu DW et al. The expression of type I growth factor receptors in the squamous neoplastic changes of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 62–71.
274. Ngan HY, Cheung AN, Liu SS et al. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 in squamous cell carcinoma of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. *Tumour Biol* 2001; 22: 176–183.
275. Baltazar F, Filho AL, Pinheiro C et al. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor expressions in different histological subtypes of cervical carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26: 235–241.
276. Lindstrom AK, Stendahl U, Tot T, et al. Predicting the Outcome of Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix Using Combinations of Individual Tumor Marker Expressions. *Anticancer Research* 2007; 27: 1609–1616.
277. Lindstrom AK, Tot T, Stendahl U et al. Discrepancies in expression and prognostic value of tumor markers in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma in cervical cancer. *Anticancer Research* 2009; 29: 2577–2578.
278. Yamashita H, Murakami N, Asari T et al. Correlation among six biologic factors (p53, p21 (WAF1), MIB-1, EGFR, HER2, and Bcl-2) and clinical outcomes after curative chemoradiation therapy in squamous cell cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74: 1165–1172.
279. Eijssink JJ, Noordhuis MG, ten Hoor KA, et al. The epidermal growth factor receptor pathway in relation to pelvic lymph node metastasis and survival in early-stage cervical cancer. *Human Pathology* (2010) 41, 1735–1741
280. Kim YT, Park SW, Kim JW. Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2002; 87: 84–89.
281. Oh MJ, Choi JH, Kim IH et al. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4760–4763.
282. Pfeiffer D, Stellwag B, Pfeiffer A, et al. Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1989; 33: 146–150.

283. Scambia G, Ferrandina G, Distefano M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is not related to the prognosis of cervical cancer. *Cancer Lett* 1998; 123: 135–139.
284. Mitsuhashi A, Tanaka N, Suzuka K, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mRNA in peripheral blood of cervical cancer patients. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 480–485.
285. Santin AD, Sill MW, Mc Meekin DS, et al. Phase II trial of cetuximab in the treatment of persistent or recurrent squamous or non-squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2011 Sep; 122(3):495-500.
286. Goncalves A, Fabbro M, Lhomme C, et al. A phase II trial to evaluate gefitinib as second- or third-line treatment in patients with recurring locoregionally advanced or metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 108: 42–46.
287. Candelaria M, Arias-Bonfill D, Chavez-Blanco A, et al. Lack in efficacy for imatinib mesylate as second-line treatment of recurrent or metastatic cervical cancer expressing platelet-derived growth factor receptor alpha. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 1632–1637.
288. Monk BJ, Mas Lopez L, Zarba JJ, et al. Phase II, open-label study of pazopanib or lapatinib monotherapy compared with pazopanib plus lapatinib combination therapy in patients with advanced and recurrent cervical cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3562–3569.
289. Farley J, Sill MW, Birrer M, et al. Phase II study of cisplatin plus cetuximab in advanced, recurrent, and previously treated cancers of the cervix and evaluation of epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2011 May 1; 121(2):303-8.
290. Kurtz JE, Hardy-Bessard AC, Deslandres M, et al. Cetuximab, topotecan and cisplatin for the treatment of advanced cervical cancer: a phase II GINECO trial. *Gynecol Oncol* 2009; 113: 16–20.
291. Ferreira CG, Erlich F, Carmo CC, et al. Erlotinib (E) combined with cisplatin (C) and radiotherapy (RT) for patients with locally advanced squamous cell cervical cancer: a phase II trial. *J Clin Oncol* 2008; 26 (Abstr 5511).
292. Nogueira-Rodrigues A, do Carmo CC, Viegas C, et al. Phase I trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy for patients with locally advanced cervical squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6324–6329.
293. Moore KN, Sill MW, Miller DS, et al. A phase I trial of tailored radiation therapy with concomitant cetuximab and cisplatin in the treatment of patients with cervical cancer: A gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol*. 2012 Dec;127(3):456-61.

294. Scholl SME, de la Rochefordiere A, Petrow P, et al. CETUXICOL, a phase II trial randomizing standard treatment with or without cetuximab in primary cervical cancer treatment. [Abstract] *J Clin Oncol* 30 (Suppl 15): A-e15535, 2012.
295. S. Bellone, G. Frera, G. Landolfi et al., "Overexpression of epidermal growth factor type-1 receptor (EGF-R1) in cervical cancer: implications for Cetuximab-mediated therapy in recurrent/metastatic disease," *Gynecologic Oncology*, vol. 106, no. 3, pp. 513–520, 2007.
296. D. D. Meira, V. H. de Almeida, J. S. Moror ó et al., "Combination of cetuximab with chemoradiation, trastuzumab or MAPK inhibitors: mechanisms of sensitisation of cervical cancer cells," *British Journal of Cancer*, vol. 101, no. 5, pp. 782–791, 2009.
297. Baselga J. New therapeutic agents targeting the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2000; 18:54S–59S.
298. Seed, MP. Angiogenesis inhibition as a drug target for disease: an update. In *Exp. Opin Invest Drugs*, 5: 1617–1637, 1996.
299. Levy G. N. Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer. *FASEB J.*, 11: 234–247, 1997.
300. Herschman, HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys Acta*, 1299: 125–140, 1996.
301. Hirst JJ, Teixeira FJ, Zakar T et al. Prostaglandin endoperoxide-H synthase-1 and -2 messenger ribonucleic acid levels in human amnion with spontaneous labor onset. *J Clin Endocrinol Metab*, 80, 517 -523, 1995.
302. Lee SH, Soyoola E, Channugam P, et al. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 267, 25934 -25938, 1992.
303. O'Sullivan MG, Huggins EM, Meade EA, et al. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages. *Biochem. Biophys Res Comm*, 187, 1123-1127, 1992.
304. Coyne DW, Nickols M, Bertrand W, et al. Regulation of mesangial cell cyclooxygenase synthesis by cytokines and glucocorticoids. *Am J Physiol*, 263, F97 -F102, 1992.
305. DuBois RN, Awad J, Morrow J, Roberts LJ and Bishop PR. Regulation of eicosanoid production and mitogenesis in rat intestinal epithelial cells by transforming growth factor-alpha and phorbol ester. *J Clin Invest*, 93, 493 -498, 1994.

306. Riese J, Ho T, Nordho A, DeWitt DL, et al. Transient expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 during mouse macrophage activation. *J Leukoc Bio*, 55, 476 – 482, 1994.
307. Bazan NG, Fletcher BS, Herschman HR and Mukherjee PK. Platelet-activating factor and retinoic acid synergistically activate the inducible prostaglandin synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5252-5256, 1994.
308. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107: 1183–88.
309. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in APC^{Δ716} knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell* 1996; 87: 803–09.
310. Liu CH, Chang S-H, Narko K, et al. Over-expression of cyclooxygenase (Cox)-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001; 276:18563–69.
311. Hial V, Horakova Z, Shaff FE and Beaven MA. Alteration of tumor growth by aspirin and indomethacin: studies with two transplantable tumors in mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, 37, 367 -376, 1995.
312. Sheng H, Shao J, Kirkland S C, Isakson P, et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest*, 99: 2254-2259, 1997.
313. Goldman AP, Williams CS, Sheng H, et al. Meloxicam inhibits the growth of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 19, 2195 – 2199, 1998.
314. Sheng H, Shao J, Morrow JD, et al. Modulation of Apoptosis and Bcl-2 Expression by Prostaglandin E2 in Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research* 58. 362-366. January 15, 1998.
315. Xin-Hua Liu, Shen Yao, Kirschenbaum A, et al. NS398, a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, Induces Apoptosis and Down-Regulates bcl-2 Expression in LNCaP Cells. *Cancer Research* 58. 4245-4249, October 1, 1998.
316. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, et al. Review. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *The Lancet Oncology* Vol 2 September 2001, 544-551
317. Plastaras JP, Guengerich FP, Nebert DW, et al. Xenobiotic metabolizing cytochromes P450 convert prostaglandin endoperoxide to hydroxyheptadecatrienoic acid and the mutagen, malondialdehyde. *J Biol Chem* 2000; 275: 11784–790.

318. Kelley DJ, Mestre JR, Subbaramaiah K, et al. Benzo[a]pyrene upregulates cyclooxygenase-2 gene expression in oral epithelial cells. *Carcinogenesis* 1997; 18: 795–99.
319. Wiese FM, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX 1 and COX 2. *Carcinogenesis* 2001; 22: 5–10.
320. Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002; 62: 625–31.
321. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705–16.
322. Gallo O, Franchi A, Magnelli L, et al. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001; 3: 53–61.
323. Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 135–38.
324. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell* 1995; 83: 493–501.
325. Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, et al. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition: implications for tumor necrosis factor-alpha apoptotic signalling. *J Biol Chem* 2001; 276: 12035–40.
326. Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) - dependent and -independent anticarcinogen effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 1469–78.
327. Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, et al. Cox-2 independent induction of cell arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001; 15: 2742–44.
328. Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 1990; 76: 655–63.
329. Balch CM, Dougherty PA, et al. Prostaglandin E2- mediated suppression of cellular immunity in colon cancer patients. *Surgery* 1984; 95: 71–77.
330. Kambayashi T, Alexander AR, Fong M, et al. Potential involvement of IL-10 in suppressing tumour-associated macrophages. Colon-26- derived prostaglandin E2 inhibits TNF-alpha release via a mechanism involving IL-10. *J Immunol* 1995; 154: 3383–90.

331. Stolina M, Sharma S, Lin Y, *et al.* Specific inhibition of cyclooxygenase-2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol* 2000; 164: 361–70.
332. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3336–40.
333. Dohadwala M, Luo J, Zhu L, *et al.* Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2 dependent invasion is mediated by CD 44. *J Biol Chem* 2001; 276: 20809–12.
334. Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsuji M, *et al.* Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* 2002; 62: 1567–72
335. Yao M, Kargman S, Lam EC, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res* 2003; 65: 586–92.
336. Dormond O, Foletti A, Paroz C, Ruegg C. NSAIDs inhibit integrin $\alpha\beta 3$ -mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration, and angiogenesis. *Nat Med* 2001; 9: 1041–47.
337. Prescott SM. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? *J Clin Invest* 2000; 105: 1511–12.
338. O'Connor JK, Avent J, Lee RJ, *et al.*, Cyclooxygenase-2 expression correlates with diminished survival in invasive breast cancer treated with mastectomy and radiotherapy. *Int. J. Radiation Oncol Biol. Phys.*, 2004. Vol. 58, No. 4, pp. 1034–1040.
339. Kim HS, Moon HG, Han W, *et al.* COX2 overexpression is a prognostic marker for Stage III breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Feb; 132(1):51-9
340. Mosalpuria K, Hall C, Krishnamurthy S, Lodhi A, *et al.* Cyclooxygenase-2 expression in non-metastatic triple-negative breast cancer patients. *Mol Clin Oncol.* 2014 Sep; 2(5):845-850.
341. Okano H, Shinohara H, Miyamoto A, *et al.* Concomitant overexpression of cyclooxygenase- 2 in HER-2-positive on Smad4-reduced human gastric carcinomas is associated with a poor patient outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6938-45.
342. Mrena J, Wiksten JP, Thiel A, *et al.* Cyclooxygenase-2 Is an Independent Prognostic Factor in Gastric Cancer and Its Expression Is Regulated by the Messenger RNA Stability Factor HuR. *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 15; 11(20):7362-8
343. Buskens CJ, Van Rees BP, Sivula A, *et al.* Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122:1800-7.

344. Heeren P, Plukker J, Van Dullemen H, et al. Prognostic role of cyclooxygenase-2 expression in esophageal carcinoma. *Cancer Letters*, 28 July 2005, Vol 225, Issue 2, 283-289.
345. Togba S, Uetake H, Higuchi T, et al. Cyclooxygenase-2 Expression: A Significant Prognostic Indicator for Patients with Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. December 2004, Vol 10, 8465–8471.
346. Elzagheid A, Emaetig F, Alkikhia L, et al. High Cyclooxygenase-2 Expression Is Associated with Advanced Stages in Colorectal Cancer. *Anticancer Res* August 1, 2013 33:3137-3143.
347. Gallo O, Masini E, Bianchi B, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Human Pathology*, July 2002, Vol 33, Issue 7, 708-714.
348. Chen WC, McBride WH, Chen SM, et al. Prediction of poor survival by cyclooxygenase-2 in patients with T4 nasopharyngeal cancer treated by radiation therapy: clinical and in vitro studies. *Head Neck*. 2005 Jun; 27(6):503-12.
349. Arakia K, Hashimoto K, Ardyanto TD, et al. Co-expression of Cox-2 and EGFR in stage I human bronchial adenocarcinomas. *Lung Cancer*. August 2004, Vol 45, Issue 2, 161–169.
350. Yuan A, Yu CJ, Shun CT, et al. Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer* 2005 Jul 1; 115(4):545-55.
351. Di JM, Zhou J, Zhou XL, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor-C and lymph node metastases in human prostate cancer. *Arch Med Res* 2009 May; 40(4):268-75.
352. Richardsen E, Uglehus RD, Due J, et al. COX-2 is overexpressed in primary prostate cancer with metastatic potential and may predict survival. A comparison study between COX-2, TGF-beta, IL-10 and Ki67. *Cancer Epidemiol* 2010 Jun; 34(3):316-22.
353. Wild PJ, Kunz-Schughart LA, Stoeck R, et al. High-throughput tissue microarray analysis of COX2 expression in urinary bladder cancer. *Int J Oncol*. 2005 Aug; 27(2):385-91.
354. Denkert C, Kobel M, Pest S, et al. Expression of cyclooxygenase 2 is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 893– 903.
355. Ali-Fehmi R, Morris RT, Bandyopadhyay S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: Correlation with tumor cell proliferation,

apoptosis, angiogenesis, and survival. *Am J Obst and Gynecol* Vol.192, Issue 3, March 2005, 819–825.

356. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in locally advanced cervical cancer patients undergoing chemoradiation plus surgery. *Int. J. Radiat Oncol Biol. Phys.*, Vol. 55, No. 1, pp. 21–27, 2003.

357. Kim YB, Kim G, Cho N, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer*. 2002; 95: 531-9.

358. Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, et al. Expression of cyclooxygenase - 2 is associated with carcinogenesis of the lower part of thoracic esophageal squamous cell carcinoma and p53 expression. *Oncol* 2002; 62: 46–54.

359. Kulke MH, Odze RD, Mueller JD, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor and cyclooxygenase 2 expression in patients receiving preoperative chemoradiation for esophageal cancer *The J Thorac Cardiovasc Surg*, Vol 127, Issue 6, June 2004, 1579-1586.

360. Loong SL, Hwang JS, Li HH. Weak expression of cyclooxygenase-2 is associated with poorer outcome in endemic nasopharyngeal carcinoma: analysis of data from randomized trial between radiation alone versus concurrent chemo-radiation. *Radiat Oncol*. 2009; 4: 23.

361. Kim YJ, Go H, Wu HG, Jeon YK, Park SW, Lee SH: Immunohistochemical study identifying prognostic biomolecular markers in nasopharyngeal carcinoma treated by radiotherapy. *Head Neck* 2011, 33(10):1458–1466.

362. Richardson CM, Richardson D, Swinsonb DE, et al. Cyclooxygenase-2 protein levels are independent of epidermal growth factor receptor expression or activation in operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* .Vol 48, Issue 1, April 2005, 47–57

363. Zhan P, Qian Q, Yu LK. Prognostic value of COX-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Dis*. 2013 Feb; 5(1):40-7.

364. Heckman MG, Tzou KS, Parker AS, et al. Lack of Association between COX-2 Staining Level and Biochemical Recurrence Following Salvage Radiation Therapy for Recurrent Prostate Cancer. *J Radiat Oncol*. 2013 Sep 1; 2(3):309-314.

365. Athavale R, Clooney K, O'Hagan J, et al. COX-1 and COX-2 expression in stage I and II invasive cervical carcinoma: relationship to disease relapse and long-term survival. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 May-Jun; 16(3):1303-8.

366. Doll CM, Winter K, Gaffney DK, et al. COX-2 expression and survival in patients with locally advanced cervical cancer treated with chemo radiotherapy and celecoxib: a

quantitative immunohistochemical analysis of RTOG C0128. *Int J Gynecol Cancer*. 2013 Jan; 23(1):176-83.

367. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients—assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst* 2003;29–34 Monographs.

368. Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 90–7 quiz 1 p following 113.

369. McIntyre-Seltman K, Castle PE, et al, Group A. Smoking is a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade 3 among oncogenic human papillomavirus DNA-positive women with equivocal or mildly abnormal cytology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1165–70.

370. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1021–7.

371. Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 96–103.

372. Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, et al. Cyclooxygenase-2 and epidermal growth factor receptor: pharmacologic targets for chemoprevention. *J Clin Oncol* 2005; 23:254–66.

373. Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res* 2007; 67:3976–85.

374. Zijlmans HJMAA, Fleuren GJ, Baelde HJ, et al. Role of tumor-derived proinflammatory cytokines GM-CSF, TNF alpha, and IL-12 in the migration and differentiation of antigen-presenting cells in cervical carcinoma. *Cancer* 2007; 109:556–65.

375. Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, et al. NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene* 2003; 22:50–8.

376. Dai Y, Zhang X, Peng Y, Wang Z. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 96–103.

377. Sukumvanich P, Cost M, Deal K, et al. Cyclooxygenase-2 expression in normal cervical epithelium and cervical neoplasia. *Presented at Society of Gynecologic Oncology 32nd Annual Meeting, Nashville, TE, March 3–7, 2001.*

378. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7:429–434.

379. Kim JS, Li S, Kim JM, Cyclooxygenase-2 expression as a predictor of para-aortic lymph node recurrence in uterine cervical cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 70, No. 5, pp. 1516–1521, 2008.
380. Ferrandina G, Lauriola L, Distefano M, et al. Increased cyclooxygenase- 2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20:973-81.
381. Kim YB, Kim G, Cho N, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. *Cancer*. 2002; 95: 531-9.
382. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 922–928.
383. Kim YB, Kim GE, Pyo HR, et al. Differential Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 60, No. 3, pp. 822–829, 2004
384. Chen HHW, Su WCH, Chou CHY, et al. Increased expression of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 is associated with poor survival in cervical cancer treated with radiotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 63, No. 4, pp. 1093–1100, 2005
385. Pyo H, Kim YB, Cho NH, et al. Coexpression of cyclooxygenase-2 and thymidine phosphorylase as a prognostic indicator in patients with figo stage IIb squamous cell carcinoma of uterine cervix treated with radiotherapy and concurrent chemotherapy *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, Vol. 62, No. 3, pp. 725–732, 2005
386. Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K et al. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix is associated with lymph node metastasis. *Gynecologic Oncology* 112 (2009) 241–247
387. Lee JS, Choi YD, Lee JH, Nam JH, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and tumor growth. *Gynecologic Oncology* 95 (2004) 523–529
388. Chen YJ, Wang LSh, Wang PH, et al. High cyclooxygenase-2 expression in cervical adenocarcinomas *Gynecologic Oncology* 88 (2003) 379–385
389. Kim JY, Lim SJ, Park K, et al. Cyclooxygenase-2 and c-erbB-2 expression in uterine cervical neoplasm assessed using tissue microarrays. *Gynecologic Oncology* 97 (2005) 337–341
390. Manchana T, Triratanachat S, Sirisabya N, et al. Prevalence and prognostic significance of COX-2 expression in stage IB cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2006 Mar; 100(3):556-60.

391. Giordano G, D'Adda T, Dal Bello B, et al. Clinicopathologic implications of the epidermal growth factor receptor, cyclooxygenase 2 expression, and humanpapillomavirus status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the elderly. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Feb; 21(2):337-48
392. Kim KY, Seol JY, Jeon GA, et al. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of bcl-2 and caspase-3 in human cervical cancer cell. *Cancer Lett* 2003; 189:157–66.
393. Raju U, Nakata E, Yang P, et al. In vitro enhancement of tumor cell radiosensitivity by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 enzyme: mechanistic considerations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 886–94.
394. Kim SH, Song SH, Kim SG, et al. Celecoxib induces apoptosis in cervical cancer cells independent of cyclooxygenase using NF-kappaB as a possible target. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 551–60.
395. Hashitani S, Urade M, Nishimura N, et al. Apoptosis induction and enhancement of cytotoxicity of anticancer drugs by celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human head and neck carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2003; 23: 665–72.
396. Raju U, Ariga H, Dittmann K, et al. Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 63: 520–8.
397. Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, et al. Celecoxib modulates the expression of cyclooxygenase-2, ki67, apoptosis related marker, and microvessel density in human cervical cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 432
398. Herrera FG, Chan P, Doll C, et al. A prospective phase I-II trial of the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib in patients with carcinoma of the cervix with biomarker assessment of the tumor microenvironment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67: 97–103
399. Solomon SD, Pfeiffer MA, et al, Investigators APCaPT. Effect of celecoxib on cardiovascular events and blood pressure in two trials for the prevention of colorectal adenomas. *Circulation* 2006; 114:1028–35.
400. Gaffney DK, Winter K, Dicker AP, et al. A phase II study of acute toxicity for Celebrex (celecoxib) and chemoradiation in patients with locally advanced cervical cancer: primary endpoint analysis of RTOG 0128. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 67: 104–9.
401. Smalley W, DuBois RN. Colorectal cancer and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 1997; 39:1–20.
402. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995; 333:609–614.

403. Khuder SA, Mutgi AB. Breast cancer and NSAID use: A meta-analysis. *Br J Cancer* 2001; 84: 1188–1192.
404. Cotterchio M, Kreiger N, Sloan M, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drug use and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:1213–1217.
405. Ahmadi N, Goldman R, Seillier-Moiseiwitsch F, et al. Decreased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck in users of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Int J Otolaryngol* 2010; 2010:424161.
406. Jacobs EJ, Rodriguez C, Mondul AM. A large cohort study of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer incidence. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 6; 97(13):975-80.
407. Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Dec 3; 95(23):1784-91.
408. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK, et al. The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 2000; 342: 1946–52.
409. Matchaba P, Gitton X, Krammer G, et al. Cardiovascular safety of lumiracoxib: a meta-analysis of all randomised controlled trials > or =1 week and up to 1 year in duration of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Ther* 2005; 27:1196–214.
410. White WB, West CR, Borer JS, et al. Risk of cardiovascular events in patients receiving celecoxib: a metaanalysis of randomized clinical trials. *Am J Cardiol* 2007; 99:91–8.
411. Farley J, Uyehara C, Hashiro G, et al. Cyclooxygenase-2 expression predicts recurrence of cervical dysplasia following loop electrosurgical excision procedure. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 596–602.
412. Hefler LA, Grimm C, Speiser P, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib (Vioxx) in the treatment of cervical dysplasia grade II–III a phase II trial. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 125:251–4.
413. Farley JH, Truong V, Goo E, et al. A randomized double-blind placebo-controlled phase II trial of the cyclooxygenase-2 inhibitor Celecoxib in the treatment of cervical dysplasia. *Gynecol Oncol* 2006; 103: 425–30
414. Kyrgiou M, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. Obstetric outcomes after conservative treatment for intraepithelial or early invasive cervical lesions: systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 2006:367.

**ANEXO I. RESUMEN DE TESIS EN INGLES – ARTICULO
EN PROCESO DE PUBLICACION**

PROGNOSIS VALUE OF THE EGFR and/or COX-2 OVER-EXPRESSION IN LOCALLY ADVANCED CERVICAL SQUAMOUS CANCER

I. INTRODUCTION

Cervical carcinoma is the fourth most common cancer among women as well as the fourth cause of cancer death in women worldwide (266,000 deaths in 2012) and in many less socio-economically developed countries remains the leading cause of death even ahead of breast cancer (1).

Cervical cancer is considered a sexually transmitted disease, whose necessary yet insufficient agent is the Human Papilloma Virus (HPV) (6,7). The extreme rarity of negative HPV cervical cancer reinforces the need to determine it during all routine screenings in addition to cervical cytology (6). However, not all HPV generated infections progress and develop a malignancy, besides other associated factors are many times required to develop the disease (age, parity, socio-economic level, sexual behaviour, genetic factors, smoking, immunosuppression, contraceptives and co-infections) (12-29).

At present, the standard treatment for locally advanced cervical cancer (LACC) is concurrent radiochemotherapy since it has managed to improve survival rates (80-84,118,120). Nevertheless, around one third of patients will suffer a relapse of the disease within the first 2-3 years after completing treatment; so there is speculation the tumours may possibly have a different molecular biology with more or less aggressiveness and/or refractoriness to treatment. This would explain why some patients with similar tumoral stages and clinical characteristics respond differently to standard treatment.

Because the molecular mechanisms of tumoral aggressiveness are usually dependents on the proliferative stimulus

induced by several tumor promoters, proto-oncogenes and oncogenes, these have been investigated in order to identify target molecules that could be used as potential predictors of survival and/or response to cancer treatment. Thus a variety of biomarkers such as Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), cyclooxygenase-2 (COX-2), coexpression EGFR/c-erbB-2, Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) have been studied in cervical carcinoma.

Regarding EGFR, its autophosphorylation leads to an increase in DNA replication and cell proliferation. Its expression in tumours has been associated with poor results post-radiotherapy (e.g. head and neck tumours) (210-216). There seems to be an inverted relationship between EGFR expression and radio-curability of tumours in pre-clinical *in vivo* studies (217,218). Furthermore, there is evidence that ionizing radiation is capable of activating the EGFR signalling pathway as well as other tyrosine kinase receptors regardless of union to the ligand (219). This activation confers a series of cytoprotector responses including the increase in cell proliferation and reduction of apoptosis mainly via stimulation of the PI3K/Akt and Ras/MAPK pathways. Therefore, it is believed that activation of EGFR counteracts the cytotoxic effect of radiation and possibly leads to the phenomenon known as "accelerated repopulation."

With regard to cervical cancer, it has been found that HPV infection is associated with increased expression of EGFR. The oncoprotein E5 of HPV Type 16 may activate EGFR and lead to an increase in EGFR recycling and overexpression (252-254).

Oncoprotein E6 has also been related to an increase in EGFR levels (255-256) and changes in its functionality. E6/E7 protein levels may alter the growth rate of cervical carcinoma cell lines via a reduction in EGFR stability at post-transcriptional level (257).

As to COX-2, the most specific data supporting a cause-relation effect between the overexpression of this marker and carcinogenesis have come from genetic studies (309, 310). Pre-clinical studies *in vivo* and *in vitro* have shown that amplification of gen and/or protein expression COX-2 is rapidly induced in response to several: tumoral promoters, growth factors, oncogenes and carcinogens. Thus elevated amounts of COX-2 in premalignant tissues and malignant tumours have been observed. This is because COX-2 affects different processes involved in carcinogenesis like: xenobiotic metabolism, angiogenesis, cell adhesion, apoptosis, inflammation, immunosurveillance and invasiveness (317-331, 333-334). Hence the over-expression has also been considered as an indicator of aggressiveness and invasiveness tumoral in several cancers including cervical cancer.

Subbaramaiah et al. (373) showed that COX-2 transcription is regulated by HPV16 oncoproteins E6 and E7 via EGFR signalling pathway. On the other hand, there are studies which show COX-2 expression is increased in the most severe degrees of cervical dysplasia and in cervix invasive cancer in comparison to inflamed and normal cervical tissue (376-378). Ferrandina et al. (397), found that patients treated with celecoxib presented a reduction of COX-2, Ki67 (cell proliferation marker) and CD31 (angiogenesis marker) in their biopsies, as well as a reduction in microvessel density. These results led to 2 clinical trials (398,400) using celecoxib in cervical cancer which did not reach good survival results but important toxicity. The effects of celecoxib associated with radiation

have been studied in cervical cancer cell lines where it was observed that celecoxib led to more radioinduced apoptosis via cell cycle detention during the G2M phase, due to inhibition of repair to cell damage caused by radiation (393,394).

Regarding the relation between EGFR and COX-2, different studies have reported that activation of the EGFR signalling pathway increases transcription of COX-2 gen in different cell types (372,373).

In summary, the literature describes that EGFR and COX-2 play an important role in oncogenic transformation, carcinogenesis and tumor invasiveness. However, there is little information available regarding the relation of these markers and cervical cancer.

It seems that evaluation of molecular targets is the future in the patient oncological management, since it would provide us with orientation regarding tumoral behaviour in each patient, so would enable the adaptation of new treatment strategies in those patients with molecular risk factors.

For this reason our study is aimed at researching the relation between the tumoral cell and EGFR/COX-2 biological markers via evaluation of treatment failure patterns and survival rates.

II. HYPOTHESIS:

We have the hypothesis that overexpression of EGFR and/or COX-2 could be in part responsible of an aggressive tumoral behaviour in our patients translated by poor survival rates

III. OBJECTIVES:

***PRIMARY OBJECTIVE:**

Determine the impact of isolated and joint over-expression of EGFR and COX-2 in the disease-free survival (DFS) and pelvic failure-free survival (PFFS).

***SECONDARY OBJECTIVES:**

1. Describe the levels of over-expression, isolated and joint, of EGFR and COX-2 diagnostic biopsies.
2. To Correlate the overexpression, isolated and joint, of EGFR and COX-2 with classical prognostic factors such as age at diagnosis, performance status (ECOG scale), tumor size, FIGO stage, and the absence or presence of pelvic lymph \pm para-aortic by imaging (CT and/or MRI and/or PET-CT)
3. Analyze the pattern of relapse based on the over-expression, isolated and joint, of EGFR and COX-2.
4. Evaluate the influence of classical prognostic factors in DFS and PFFS.

IV. MATERIALS AND METHODS

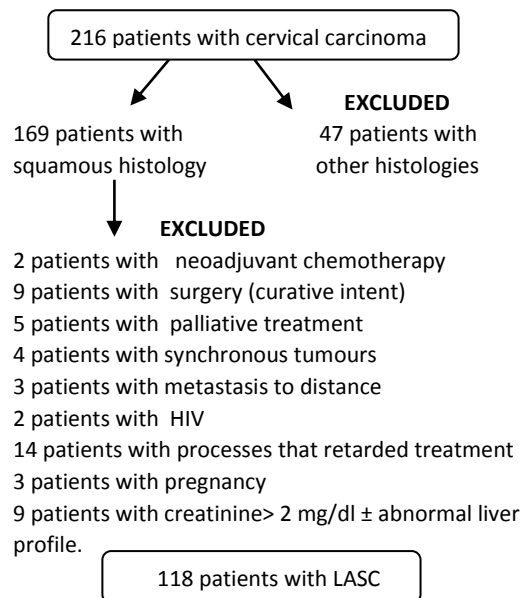
1. Patient selection

This is an observational longitudinal study with the prospectively data collected from patients diagnosed with locally advanced cervical carcinoma (LASC), FIGO IB2-IVA stage, treated at the Radiation Oncology Department of the University Hospital 12 de Octubre (Madrid-Spain) between January 2004 and April 2013. The determination of EGFR and COX2 in the diagnostic biopsies was done blind and prospectively by the pathologist, 216 patients were treated during the period indicated, however 118 were selected as per the following criteria (see Graph A).

- Inclusion criteria: Patients diagnosed of cervical carcinoma by biopsy with immunohistochemical determination for EGFR and COX-2, age over 18 and under 85 years, FIGO IB2 –IVA stage, squamous histology, and patients treated solely with radical radiochemotherapy.
- Exclusion criteria: Patients not valid for standard chemotherapy (e.g. creatinine >2 mg/dl, hepatic profile alteration, neutrophils < 2000 mm³, platelets < 100 000 mm³), other treatment schemas different to radiochemotherapy and/or interventions which would delay the concomitant treatment

(e.g. neoadjuvant chemotherapy, surgery, etc.), presence of synchronic second tumours, distant metastasis presence at time of diagnosis (except para-aortic lymph node metastasis), primary or acquired immunodeficiency, and pregnancy.

Graph A



2. Radiotherapy Treatment

*** First phase:** Pelvic radiotherapy was administered with 3D dosimetry, 4 isocentric conformed fields, with an energy of 18 MV photons from a Siemens linear accelerator.

The PTV dose was 46 Gy with classic fractioning (5x200cGy). In 97 cases (82%) the radiotherapy treatment field was extended to the para-aortics (identical administration to the previous), the PTV dose was 45 Gy with a fractioning of 5x180 cGy.

*** Second phase:** A single application of LDR brachytherapy was performed on 51 patients (43.5%) and commencement the treatment was between 1 and 10 days after completion of external radiotherapy (colpostato used: Delouche® or personalised Chassagne mould; Isotope: Cs-137, source projector: Curietron®). Dose prescribed to point A: 30 Gy.

The mean dose administered to point A with brachytherapy was 28Gy (median =29, p25=21, p75=35) and was limited by the mean dose received in the rectum and/or bladder (no more than 65-70 Gy, external and endocavity radiotherapy).

HDR brachytherapy was delivered to 64 patients (54%) in 3 or 4 applications, starting between 7 and 10 days post-external radiotherapy (personalised Chassagne mould, Isotope: Ir-192, source projector: Microselectron®). A dose of 30 Gy to point A was delivered to 33 patients and a dose of 7 Gy to CTV to 31 patients (one session for week).

Brachytherapy was not performed on 3 patients (2.5%), (technical impossibility), so a boost was performed with external radiotherapy over the central pelvis (3D dosimetry, 4 reduced conformed isocentric fields with an energy of 18 MV photons); total accumulated dose on PTV 65-70 Gy to classic fractionation (5x180 or 5x200 cGy).

3. Chemotherapy Treatment

In the 118 selected patients chemotherapy and external radiotherapy were applied concurrently, with a cisplatin scheme (CDDP): 40 mg/m²/ iv weekly.

The last CDDP cycle was administered to 16 of the 118 patients (14%) during LDR brachytherapy application. Chemotherapy was not administered simultaneously with HDR brachytherapy. The mean number of CDDP cycles delivered was 5.5 (median= 6, range: 2-7). The mean total CDDP dose delivered per patient was 340 mg. (median: 350, p25 = 300, p75 = 380, range: 120-490).

In patients with partial clinical response, chemotherapy was used prematurely when the serum tumoral marker (squamous cell Antigen, SCC-Ag.) after finishing treatment scored for disease in the absence of rash or recall reaction or psoriasis. These patients (n=5) were treated with 6 cycles of carboplatin-paclitaxel.

In those patients who exhibited partial response and normal SCC-Ag. post-treatment (but had marked the diagnosis), we waited until reviewing the three months to check the status of the patients. Patients with stabilization - progression disease were treated symptomatically, due to its poor condition.

4. Follow-up

Patient follow-up was every 3 months during the first 2 years, then every 6 months during the following 3 years and once a year from year 5. During each appointment the patient underwent: a general physical examination, gynecological examination, serum analysis, as well as evaluation of late toxicity.

During first 5 years, a chest X-ray and abdomen-pelvic CT were performed each 6 months and then once a year. From June 2009, 18-FDG-PET-CT was used for staging and external radiotherapy planning (41 patients, 30%), likewise for tumoral response evaluation (3 months post-treatment completion).

Date of our patients' last follow-up appointment was October 2013, having lost 8 patients (7 without tumour and 1 with tumour). Mean time follow-up for entire sample was 56.5 months ±DS 10.5 (median 56 months). Mean time follow-up of lost patients was 48 months ± DS 10.5 (median 46 months).

Evaluation of acute toxicity was performed as per Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 3. Late toxicity evaluation performed as per RTOG/EORTC Late Radiation Morbidity Scoring Schema

5. Immunohistochemical Analysis

The biopsies were fixed in buffered formalin and included in paraffin. Several 3 micron sections were cut from the blocks obtained and mounted on silanized slides. One was stained with H&E for diagnosis and the rest was used for the immunohistochemical

study. The slides were left all night at 37° C. Prior to performing the IHC techniques, the preparations were deparaffinized in xylol and decreasing alcohols (100°,96°,70°) until water to hydrate the sample.

An automated immunostainer TechMate 500 (Dako, Glostrup Denmark) was employed using strepto-avidine-biotin-peroxidase system optimized for automatic stainer (LSAB by Dako).

*** Measuring EGFR:** The antibody used to mark the EGFR protein was an anti-EGFR monoclonal antibody (clone H11 Ref. M-3363 -Dako; Glostrup Denmark). The samples were subjected to enzymatic digestion with protease type XXIV (0.5 mg/ml) during 10 minutes at room temperature.

The primary anti-EGFR antibody was used at a dilution of 1/100 with a 30 min incubation time at room temperature. The streptoavidine-biotin-peroxidase system was applied in 2 steps of 20 minute incubation each one

The chromogen used was diaminobenzidine and was incubated 10 min at room temperature and a counterstain with haematoxylin was applied during 1 min. Positive (using skin) and negative (primary antibody replacement with non-immune serum) controls were included in each execution. The Immunoreactivity evaluation was based on semi-quantitative analysis scored as the percentage of stained cells. EGFR expression was considered assessing membrane staining.

Biopsies were considered EGFR (-): if none of cells were stained, EGFR (+): 1-30 % cells had membrane staining, EGFR (++) : 31-69 % cells had membrane staining, and EGFR (+++): ≥70% had membrane staining. For statistical effects, biopsies with moderate/high EGFR staining (++ and +++, respectively) were considered positive in comparison to those that had little or no staining (- and + respectively) and were considered negative

*** Measuring COX-2:** The antibody used to mark the COX-2 protein, was a monoclonal anti-COX-2 antibody (clone CX-2949 Ref. M361 - Dako; Glostrup Denmark). Samples were incubated 2 mins at maximum pressure in a pressure cooker containing 1.5 litres of buffered EDTA ph8. The primary anti COX-2 antibody was used at a dilution of 1/50, with a 30 min incubation time at room temperature. The strepto-avidine-biotin-peroxidase system was applied in 2 steps of 20 minute incubation each one

The chromogen used was diaminobenzidine incubated 10 min at room temperature and a counterstain with haematoxylin applied during 1 min. Positive (colo -rectal adenocarcinoma) and negative (primary antibody replacement with non-immune serum) controls were included in each execution. The immunoreactivity evaluation was based on semi-quantitative analysis, scored as percentage of stained cells. The COX-2 expression was considered assessing the cytoplasmic stain.

Biopsies were considered COX-2 (-): if none of cells were stained, COX-2 (+): 1-30 % cells had cytoplasmic staining, COX-2 (++) : 31-69 % cells had cytoplasmic staining and COX-2 (+++): ≥70% cells had cytoplasmic staining. As for statistical effects, biopsies with moderate/high COX-2 staining (++ and +++, respectively) were considered positive in comparison to those with little or no staining (- and + respectively) that were considered negative.

6. Statistical Analysis

The variables considered in this study are included in Table nº1.

Analysis of the qualitative variables was performed via absolute frequency distribution and percentage; and of the quantitative variables via their central trend measurements (mean, median), accompanied by dispersion measurements (standard deviation, interquartile range). The χ^2 - test was used to estimate distribution

and significance of the frequencies. The actuarial method was used to determine disease free survival (DFS) and pelvic failure free survival (PFFS) at 3 and 5 years.

Univariate analysis was performed using the log-rank test and multivariate analysis with the Cox proportional risk regression model, as well as the variables that reached statistical significance in the univariate analysis and those that had tendency towards significance. Statistical analysis was performed using software SAS v.9.3.

V. RESULTS

1. Analysis of patients

Clinical characteristics and treatment administered to the 118 selected patients are included in Tables nº1 and nº2.

Patients were grouped according to the EGFR expression, 33 patients (28%) without overexpression vs. 85(72%) with overexpression) and regarding the COX-2 expression, 77 patients (65%) without overexpression vs 41 (35%) with over-expression.

Of the 118 biopsies: 29 (24%) were [EGFR and COX-2 positive], 68 (58%) [EGFR positive and COX-2 negative or EGFR negative and COX-2 positive] and 21 (18%) [EGFR and COX-2 negative].

2. Response to concurrent Radio-Chemotherapy and Follow-up

At finishing of treatment the results obtained were: 94 patients (80%) with complete clinical response, 22 (18%) with partial clinical response and 2 (2%) with disease stabilisation.

From radiotherapy completion to the last follow-up date, 85 patients (72%) presented no treatment failure and 33 patients (28%) suffered some type of relapse.

On the date of the last appointment: 80 patients (67.8%) live without tumour (78 of whom suffered no failures and 2 failures were rescued) 4 patients live with tumour (3.4%), 26 patients (22.03%) died from the tumour, 1 patient (0.85%) died without tumour (chronic intestinal toxicity), lastly 7 patients (6%) were lost during follow-up (6 tumour free patients and 1 with tumour).

Actuarial OS at 3 and 5 years was 79% (CI 95%:70-85) and 77% (CI 95%:68-84), respectively.

Actuarial DFS at 3 and 5 years was 71% (CI 95%: 62-78) for both. The mean DFS of the total sample was 26.4 months \pm DS 12.3 (range: 0-115); 64 months \pm DS 28.3 (range: 6-115) for the 84 patients without failure and for the 33 patients with any kind of failure it was 8.4 months \pm DS 8.2 (range: 0-37).

Actuarial PFFS at 3 and 5 years was 81% (IC 95%: 72-87) for both. The mean PFFS for entire sample was: 24 months \pm DS 10.7 (range: 0-115); 58.5 months \pm DS 30.8 (range: 2-115) for the 97 patients without pelvic failure and 7.2 months \pm DS 7.1 (range: 0-33) for the 21 patients with pelvic failure.

3. Toxicity results

Acute hematological toxicity grade 3-4 was 9.3%. Acute gastrointestinal and (GI) and urinary (GU) toxicity grade 3 was 8.5% and 7.6% respectively. Grade 4 acute toxicity was not observed in any of the cases.

Late gastrointestinal toxicity grade 3 was 5% (6 patients), grade 4 was 0.85% (1 patient) and grade 5 was 0.85% (1 patient died from intestinal obstruction due to radical enteritis with negative autopsy for tumour). Late urinary toxicity grade 3 was in 8.5% (10 patients).

4. Relapse pattern depending on EGFR and/or COX-2 overexpression.

For this study we grouped the relapse patterns as: 1) pelvic failure when the first event failure was a local +/- pelvic failure, associated or not to other types of failure; 2) failure to distance, when the first event failure was a failure to distance, associated or not to other types of failure.

We observed 13 local failures (cervix ± parametria ± vagina ± uterus); 4 regional failures (only pelvic lymph node); 4 local failures + regional ± para-aortic ± metastasis to distance; 2 para-aortic failures + metastasis to distance; 1 pure para-aortic failure, 9 exclusive metastasis to distance and 85 patients failure free.

Regarding the EGFR overexpression associated with pelvic failure (loco-regional) or failure to distance, we did not find statistically significant differences ($p=0.12$ and $p=0.66$ χ^2 test, respectively). Likewise we found no relation between COX-2 overexpression and pelvic failure or failure to distance ($p=0.51$ and $p=0.24$ χ^2 test, respectively).

Finally, in assessing both markers, we not found statistically significant differences for either pelvic failure or failure to distance.

5. Relationship between EGFR and/or COX-2 overexpression with classic prognosis variables

We found that EGFR overexpression is age related >50 years old ($p=0.01$), and in relation to ECOG 2-3 we objectified a trend ($p=0.08$).

Regarding COX-2, we found a trend towards statistical significance ($p=0.06$) between its overexpression and advanced FIGO stage (III-IVA).

Lastly, we found a statistically significant relation between FIGO stage and the overexpression of both markers ($p=0.02$); thus we found the most advanced stages (III-IVA) are related to the combined overexpression of both markers. We found no statistically significant results in relation to the other classic prognosis variables

6. Univariate and multivariate analysis for DFS and PFFS

Tables nº3 and nº4 summarize our results. The isolated EGFR overexpression, the isolated COX-2 overexpression or both together, did not reach statistically significance in the univariate analysis for DFS and PFFS, so those were not included in the multivariate analysis.

VI. DISCUSSION

We observed 72% over-expression of EGFR, similar to previous studies (268, 269, 274, 276, 280) and over-expression of COX-2 was 35% as also described in earlier studies (380, 383, 385).

The results obtained (high percentage EGFR overexpression and moderate COX-2 overexpression) could be explained because depending on the cervical cancer histological type there is a greater or lesser expression predilection of said markers.

According to literature, squamous histology is related to a greater EGFR expression (263, 265, 267, 270, 272, 275, 277, 279) and the adenocarcinomas with greater COX-2 expression (275, 380, 383, 384, 389, 390). So in some way this would lead us to elucidate that each oncoprotein has a specific expression according to histological type, which might be related to tumoral biological behaviour.

Therefore, taking into account the relation between histology and the expression of these markers, our results would be influenced by the exclusive inclusion of cervical epidermoid tumours.

As to the main purpose of our study, we found no relation between EGFR and/or COX-2 overexpression with either DFS or PPFS.

Regarding to studies that assess survival rates, we have found conflicting results; so there are studies that report a poor prognosis when patients have overexpression of EGFR (Table nº7, see thesis), resulting in lower OS (263, 265-267, 280, 282), a lower SLE (264, 268-270, 280) and a lower SLFP (269, 268); and even found higher serum EGFR levels according to the progression of the disease from normal tissue, CIS and invasive cervical carcinoma finally (281). Moreover, there are studies like ours in which they have not found a value prognosis to EGFR in the univariate analysis (272, 274, 275, 276, 278, 279, 283; Table nº8, see thesis).

The same occurs for COX-2, our study like others (275, 276, 387, 389, 390, 391, Table nº11, see thesis), found no relation between the overexpression of this marker and a worse prognosis. However, there are other studies which observed a poor OS (381, 380, 383, 384, 385) and a worse DFS (381, 382, 384-386) (Table nº10, see thesis).

With regard to studies which analysed the joint overexpression of EGFR and COX-2, we have the studies of Kim GE (268) and Giordano (391); those found in the univariate analysis prognosis value for the joint overexpression of both markers, which translated in to a reduction of OS. However only Giordano carried out the multivariate study and did not confirm prognosis value for OS. Nevertheless, after the multivariate analysis Kim GE observed a relation between the joint overexpression of EGFR and COX-2 with a lower DFS.

This diversity in results could be explained by the variety of cut-off points used to denominate an overexpression of EGFR. The

studies which used a low cut-off point found a prognosis value for EGFR (264, 266, 268, 270), unlike those who used a high cut-off point (274, 276) and found no prognosis value for EGFR.

Another possible explanation for this disparity in the results is that the vast majority of studies that have evaluated the expression of EGFR (263-270, 272, 274-276, 278, 279) and COX-2 (268, 275, 276, 380-391) in cervical cancer by immunohistochemistry have not been homogeneous in the use of antibodies and semiquantitative scores for considering an over-expression; in other cases EGFR expression was measured by ELISA - biochemical techniques (280, 281) with different cut-off points, by radioligand techniques (282, 283), etc.

Likewise the populations studied were very heterogeneous regarding: histological type, diversity of tumoral stages (early, advanced or both), different treatments administered (surgery, radical external radiotherapy, induction chemotherapy followed by surgery or external radiotherapy, etc.).

We should highlight that some of the studies which found prognosis value for EGFR and/or COX-2 did not evaluate other clinical features which mark disease evolution in patients, such as: performance status- ECOG, lymph node metastasis, etc., EGFR studies (264-268, 270, 280) or the COX-2 studies (268, 380, 381, 382, 383-385).

In our study, we considered those above clinical features in the analysis of survivals, and the relationship of these with the overexpression of EGFR and / or COX-2. We find that in the multivariate analysis for DFS actuarial 3 and 5 years the only independent prognostic factor was ECOG 2-3 ($p = 0.01$, HR 2.6, 95% CI 1.1 - 5.7)

As to the relation between ECOG 2-3 and EGFR overexpression we found a trend towards significance ($p=0.08$). Regarding ECOG and the isolated COX-2 overexpression or associated to EGFR we found no significant relation ($p=0.68$ and $p=0.28$, respectively).

With regard to actuarial PFFS at 3 and 5 years, the advanced FIGO stage (III-IVA) was the only variable which maintained prognosis independence ($p=0.04$; HR 2.9; IC 95% 1.0-9.5). The performance status (ECOG 2 and 3), tumoral size ($>6\text{cm}$) and positive lymph nodes were related to a worse PFFS in the univariate analysis but not in the multivariate.

Nevertheless, it should be noted we found a trend towards significance between the advanced FIGO stage and COX-2 overexpression ($p=0.06$). Furthermore, we found a statistically significant relation between the joint EGFR and COX-2 overexpression and advanced FIGO ($p=0.02$, see Table nº24 in the thesis). Other studies which only analyzed the EGFR overexpression in relation to FIGO did find an association unlike our study (265, 270).

On the other hand, we found a significant association between overexpression of EGFR and age > 50 years ($p = 0.01$, Table No. 23), about it, it is interesting to describe that in many populations has been shown a second peak prevalence of HPV high risk among women who do not eradicate the infection by high-risk HPV, in the menopause is produced transition from multiple infections to a single type of infection selecting one viral clone integrated, leading to a process of aggressive disease and progressive (5); in the literature expression of EGFR is associated with HPV infection (252-257).

As to the patterns of pelvic failure or failure to distance in relation to the isolated and associated overexpression of EGFR and COX-2, we found no significant relation.

In the univariate analysis of the relation between DFS and lymph node metastasis (pelvic \pm para-aortic) we did not find a negative prognosis value as expected. A possible explanation for this finding is that apart from delivered concurrent chemotherapy, during radiotherapy a boost was administered to the lymph node metastasis in 44% of cases (we only administer boost to the lymph node metastasis when the nodes had a diameter of $\geq 1.5\text{cm}$). In addition 82% of patients were treated with radiotherapy extended to the para-aortics (34% as prophylaxis). For all the foregoing, we believe that the considerations taken in both radio- and chemotherapy may have managed to detain and/or eliminate the microscopic disease deposited at lymph node level which somehow led to DFS improvement.

However, lymph node metastasis reached a significant prognosis value in the PFFS in the univariate analysis but not in the multivariate analysis.

In our study, although our patients had locally advanced tumours with aggressive features (64% tumors $>6\text{cm}$ and 48% with lymph node involvement); OS, DFS, PFFS actuarial at 5 years of 77%, 71% and 81% were achieved respectively. Moreover failure to distance as first event was 10.2%; this is noteworthy, because it is a very low percentage compared to other studies (92,124,126).

After all the foregoing, we would like to emphasize in favour of our results regarding the prognosis value of EGFR and/or COX-2 overexpression, that there are studies which have used drugs whose action inhibits EGFR (285, 289, 290,293), tyrosine-kinase (286-288) and COX-2 (398,400), those which did not improve survival. This might make us think that these markers have no relation to disease prognosis, although there are few studies and with a small sample size.

On the other hand, among the weaknesses found in our study, our cohort is not homogeneous since we recruited patients with FIGO IB2 to IVA stages. Furthermore, during the recruitment between 2004 and 2013 we have had changes in relation to radiotherapy treatment (84 patients received brachytherapy aimed at point A, 51 patients with LDR brachytherapy and 33 patients with HDR brachytherapy; and 31 patients with HDR brachytherapy to CTV) and changes in diagnosis protocol (initially CT \pm MRI and later PET-CAT was included). Another limitation encountered is that our sample size was small (118 patients), yet the percentage of losses of patients during follow-up was low 6.7%.

Despite these weaknesses, we should mention that our study has a long follow-up period (median 56 months) even in the lost patients (median 46 months); so we have had sufficient time to detect events.

In addition we must emphasize that our study has not selection bias since the determination of EGFR and COX-2 was prospectively (before the treatment) and blind to the pathologist who was in charge of immunohistochemistry, besides we have not excluded patients with ECOG ≥ 2 therefore this work is a reflection of everyday clinical practice.

Another strength worthy of mention is that all our patients received standard radio-chemotherapy unlike other studies which included other treatment guidelines (neoadjuvant chemotherapy, surgery, etc.) without making any distinction among them.

Finally, our study takes into consideration variables that can influence the clinical course of the disease such as age, ECOG, FIGO stage, tumor size and lymph node metastases.

V. CONCLUSIONS

We did not find in this study an association between overexpression of EGFR and/or COX-2 regarding the DFS and PPFS, despite being described in literature that these markers play a role in tumor biology and apparently also in its evolution, as well as that are overexpressed depending on histological type. However in our study we found relation of over-expression of these markers with age, ECOG and FIGO stage.

After all said above we conclude that there is a need for homogeneous, prospective studies with a standardized determination for these markers, but of course not leaving aside a thorough analysis of the clinical data of interest as performance status, lymph node involvement, etc., to objectify really conclusive results and to resolve uncertainties left by the disparity of results found in the literature.

Table nº3. Univariate analysis for Disease Free Survival (DFS) and Pelvic Failure Free Survival (PPFS)							
Variable	Total	DFS a 3years % (CI 95%)	DFS a 5years % (CI95%)	p value	PPFS a 3years % (CI95%)	PPFS a 5years % (CI 95%)	p value
Age							
≤50 years	50	66(51-78)	66 (51-78)	0.39	75(60-85)	75(60-85)	0.13
>50 years	68	74(62-83)	74(62-83)		86(74-92)	86(74-92)	
ECOG							
0-1	100	77(67-84)	77(67-84)	<0.0001	85(77-91)	85(77-91)	<0.004
2-3	18	38 (17-60)	38(17-60)		54(26-75)	54(26-75)	
Size							
Tumoral							
≤6cm	42	81(66-90)	81(66-90)	0.04	90(76-96)	90(76-96)	0.07
>6cm	76	65(53-75)	65(53-75)		76(64-84)	76(64-84)	
Stage							
FIGO							
Ib2-IIIB	57	84(71-91)	84(71-91)	<0.005	93(82-97)	93(82-97)	<0.002
III-IVA	61	60(46-71)	60(46-71)		70(56-80)	70(56-80)	
Pelvic+/-para-aortic lymph nodes							
Positive	57	65(51-76)	65(51-76)	0.18	74(59-83)	74(59-83)	0.06
Negative	61	76(63-85)	76(63-85)		88(76-94)	88(76-94)	
EGFR							
Negative(-/+)	33	79(60-89)	79(60-89)	0.36	90(74-96)	90(74-96)	0.15
Positive (++)/+++)	85	68(57-77)	68(57-77)		77(67-85)	77(67-85)	
COX-2							
Negative (-/+)	77	72(60-81)	72(60-81)	0.86	79(68-87)	79(68-87)	0.50
Positive (++)/+++)	41	70(53-82)	70(53-82)		84(68-93)	84(68-93)	
Joint expression							
EGFR & COX-2(-)	21	76(52-89)	76(52-89)	0.68	85(61-95)	85(61-95)	0.87
EGFR or COX-2(+)	68	73(60-82)	73(60-82)		81(69-88)	81(69-88)	
EGFR & COX-2(+)	29	64(44-78)	64(44-78)		77(57-89)	77(57-89)	
Table nº4. Multivariate analysis for Disease Free Survival (DFS) and Pelvic Failure Free Survival (PPFS)							
Variable	DFS			PPFS			
	Hazard ratio	(CI 95%)	value p	Hazard ratio	(CI95%)	value p	
ECOG 2-3	2.6	(1.1-5.7)	0.01	2.0	(0.7-5.2)	0.14	
Tumoral size >6cm	1.7	(0.7-4.1)	0.20	1.6	(0.5-4.9)	0.40	
Stage FIGO III-IVA	1.9	(0.8-4.4)	0.13	2.9	(1.0-9.5)	0.04	
Positive lymph nodes	----	----	----	1.5	(0.6-3.9)	0.34	

Table n°1. Clinical characteristics of the patients studied

Table n°2. Description of treatments given

<i>Variables</i>	<i>Number</i>	<i>(Percentage)</i>	<i>n° patients</i>	
Age				
Median	53			
≤50 years	50	(42)		
>50 years	68	(58)		
ECOG				
0	10	(8.4)		
1	90	(76.2)		
2	14	(12)		
3	4	(3.4)		
FIGO Stage				
IB2-IIA	13	(11)		
IIB	44	(37.3)		
IIIA-B	52	(44.1)		
IVA	9	(7.6)		
Tumoral size				
≤ 6 cm	42	(36)		
> 6 cm	76	(64)		
Nodes in CT +/- MRI +/- PET-CT				
Negative	61	(52)		
Pelvic positive	41	(35)		
Para-aortic positive (+/- pelvic)	16	(13)		
Expression EGFR				
-	13	(11)		
+	20	(17)		
++	26	(22)		
+++	59	(50)		
Expression COX-2				
-	35	(29.6)		
+	42	(36)		
++	31	(26)		
+++	10	(8.4)		
Joint Overexpression				
[EGFR and COX-2 negative]	21	(18)		
[EGFR or COX-2 positive]	68	(58)		
[EGFR and COX-2 positive]	29	(24)		
Chemotherapy:				
Cisplatin	118			<i>Average dose of cisplatin / patient</i> 340mg (p25=300, p75=380 mg) Average number of cycles: 5.5
External radiation therapy:				<i>Dose</i>
Pelvic	21			46 (5x200 cGy)
Pelvic and para-aortic	97			45 Gy (5x180 cGy)
Boost:				<i>Average dose to point A</i> <i>/ Vol. isodose 60 Gy</i>
Brachytherapy LDR	51			28 Gy (p25:22,p75:35) /255 cc (r: 30-690cc)
Brachytherapy HDR	64			3 or 4 applications of 7Gy to CTV (31 pt) 3 or 4 applications of 7Gy to point A(33 pt)
External radiation therapy in central pelvic	3			<i>Dose / Total dose</i> 15-20 Gy / 65-70 Gy (5x180 o 5x200 cGy)
External radiation therapy in nodes pathologic (boost)	25			<i>Dose/ Total dose</i> 10 Gy / 55 Gy